

**Signaltransduktion des Luteinisierenden Hormon-
Releasing Hormons (LHRH) in menschlichen
Ovarial- und Endometriumkarzinomen**

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Peter Völker
aus Marburg

D-35037 Marburg, Juni 1999

Vom Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 25. Juni 1999 angenommen

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. B. Kadenbach

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. G. Emons

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Juli 1999

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Januar 1996 bis April 1999 im Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg, am Medizinischen Zentrum für Frauenheilkunde und Geburtshilfe unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. G. Emons durchgeführt.

Christiane gewidmet,
weil sie mich eines hat verstehen lassen:

Frage Dich,
wo des Menschen Ruhm beginnt und endet.
Und sieh,
daß mein Ruhm nur auf meinen Freunden gründet.

William Butler Yeats

Inhaltsverzeichnis

Signaltransduktion des Luteinisierenden Hormon-Releasing Hormons (LHRH) in menschlichen Ovarial- und Endometriumkarzinomen

1. Einleitung	1
1.1. Das Ovarialkarzinom	1
1.1.1. Epidemiologie und Ätiologie	1
1.1.2. Histologie und Stadieneinteilung	3
1.1.3. Therapie der Ovarialkarzinome	5
1.1.3.1. Operative Therapie	5
1.1.3.2. Chemotherapie	6
1.1.3.3. Strahlentherapie	6
1.1.3.4. Endokrine Therapie	6
1.2. Das Endometriumkarzinom	8
1.2.1. Epidemiologie und Ätiologie	8
1.2.2. Histologie und Stadieneinteilung	10
1.2.3. Therapie der Endometriumkarzinome	11
1.2.3.1. Operative Therapie	12
1.2.3.2. Chemotherapie	12
1.2.3.3. Strahlentherapie	12
1.2.3.4. Endokrine Therapie	13
1.3. Molekulare Grundlagen der Krebsentstehung	14
1.3.1. Onkogene und Tumorsuppressor-Gene beim Ovarial- und Endometriumkarzinom	14
1.3.2. Wachstumsfaktoren und Peptidhormone bei der Zelltransformation	16
1.3.3. Autokrine Wachstumsstimulation	17
1.4. Das Luteinisierende Hormon-Releasing Hormon	18
1.4.1. Mechanismen der LHRH-vermittelten Signaltransduktion	19
1.4.2. LHRH-Analoga	20
1.4.3. LHRH-Analoga bei der endokrinen Manipulation von Ovarial- und Endometriumkarzinomen	22
1.5. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit und Versuchsplanung	24

2. Material und Methoden	26
2.1. Abkürzungen	26
2.2. Zellkultur	27
2.2.1. Zelllinien	27
2.2.2. Kultivierung der Zellen	27
2.2.2.1. Kulturmedien	29
2.2.2.2. Passagieren adhärenter Zellen	29
2.2.2.3. Kryokonservierung	30
2.2.3. Proliferationsassays	31
2.3. Biochemische Methoden	32
2.3.1. Alkalische Lyse	32
2.3.2. Quantifizierung von Proteinen	32
2.3.3. LHRH-Radiorezeptorassay	33
2.3.3.1. Präparation der Zellmembranen	33
2.3.3.1.1. Präparation der Zellmembranen aus Zellkulturen	34
2.3.3.1.2. Präparation der Zellmembranen aus Tumoren	34
2.3.3.2. Ansatz des Rezeptorassays	35
2.3.3.3. Detektion und Auswertung	36
2.3.3.4. Radioaktive Markierung von Triptorelin	36
2.3.4. Messung der LHRH-Rezeptor-Regulation mit dem LHRH-	
Radiorezeptorassay	37
2.3.5. Radioimmunoassay	38
2.3.5.1. LHRH Radioimmunoassay	38
2.4. Molekularbiologische Methoden	40
2.4.1. RNA-Isolierung	40
2.4.1.1. Isolierung von Gesamt-RNA	41
2.4.1.2. Quantifizierung von Nukleinsäuren	42
2.4.2. RT-PCR	42
2.4.2.1. cDNA-Synthese	42
2.4.2.2. Polymerase-Ketten-Reaktion	43
2.4.2.3. Oligonukleotid-Primer	44
2.4.2.3.1. Aufarbeitung HPLC-gereinigter Oligonukleotide	45
2.4.3. Agarose-Gelelektrophorese	46

2.4.4. Restriktionsanalysen	47
2.4.5. Southern Blot	47
2.4.5.1. Kapillarblot	48
2.4.5.2. Prähybridisierung	49
2.4.5.3. Markierung der cDNA-Sonden mit Meerrettichperoxidase	50
2.4.5.4. Hybridisierung	50
2.4.5.5. Detektion	50
2.4.5.6. cDNA-Sonden	51
2.4.6. Quantitative RT-PCR	51
2.4.7. Western Blot	53
2.4.7.1. Präparation der Proben und Inkubationsansatz der Zellkultur	54
2.4.7.2. SDS-Gelelektrophorese	54
2.4.7.3. Semi-Dry-Immunoblot mit Kohlenstoffelektroden (Western Blotting)	55
2.4.7.4. Immunreaktion und Detektion	57
2.5. Patientinnenkollektiv	57
3. Ergebnisse	60
3.1. Lichtmikroskopischer Vergleich der Morphologie der Ovarialkarzinomzelllinien EFO-21 und EFO-27 und der Endometriumkarzinomzelllinien Ishikawa und HEC-1A	60
3.2. Proliferationsassays von Zellen in Kultur unter Einfluß der LHRH-Analoga Triptorelin und Cetrorelix	62
3.2.1. Zeit- und dosisabhängige Inhibition der Proliferation von EFO-21, EFO-27, Ishikawa und HEC-1A durch den LHRH-Agonisten Triptorelin	62
3.2.2. Zeit- und dosisabhängige Inhibition der Proliferation von EFO-21, EFO-27, Ishikawa und HEC-1A durch den LHRH-Antagonisten Cetrorelix	64
3.3. Bestimmung von LHRH-Immunreaktivität in Zellkulturextrakten und in Tumorgewebeproben	66
3.3.1. Nachweis von LHRH-Immunreaktivität in Proteinextrakten aus Zelllinien	66
3.3.2. Nachweis von LHRH-Immunreaktivität in resezierten Tumorgeweben	67
3.4. Bestimmung von LHRH-Bindungsstellen in Zellkulturextrakten und Tumorgewebeproben durch einen LHRH-Radiorezeptorassay	68

3.4.1. Bestimmung von LHRH-Bindungsstellen in Plasmamembran-proteinfraktionen aus Zellkulturen	68
3.4.2. Bestimmung von LHRH-Bindungsstellen in resezierten Tumorgewebe	70
3.5. Molekularbiologische Ansätze	72
3.5.1. Anwendung der Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) zum Nachweis spezifischer mRNA-Sequenzen	72
3.5.1.1. Kontrolle der RT-PCR durch Nachweis der Expression von mRNA für GAPDH	73
3.5.1.2. Nachweis der mRNA-Expression für LHRH in Zelllinien und Tumorgewebe durch RT-PCR, Southern Blot und Restriktionsanalyse	74
3.5.1.3. Nachweis der mRNA-Expression für den LHRH-Rezeptor in Zelllinien und Tumorgewebe durch RT-PCR, Southern-Blot und Restriktionsanalyse	77
3.6. Untersuchung der Rezeptor-Regulation auf Gen- und Proteinebene durch Triptorelin und Cetrorelix in Ovarial- und Endometrium-karzinomzelllinien	82
3.6.1. Nachweis der Regulation der mRNA-Expression für den LHRH-Rezeptor durch quantitative RT-PCR	82
3.6.1.1. Nachweis der Regulation der mRNA-Expression für den LHRH-Rezeptor durch Inkubation mit dem LHRH-Agonisten Triptorelin in Tumorzelllinien	83
3.6.1.2. Nachweis der Regulation der mRNA-Expression für den LHRH-Rezeptor durch Inkubation mit dem LHRH-Antagonisten Cetrorelix in Tumorzelllinien	85
3.6.2. Nachweis der Regulation der LHRH-Bindungsstellen durch einen Radiorezeptorassay	86
3.6.2.1. Nachweis der Regulation der LHRH-Bindungsstellen durch Inkubation mit dem LHRH-Agonisten Triptorelin in Tumorzelllinien	87
3.6.2.2. Nachweis der Regulation der LHRH-Bindungsstellen durch Inkubation mit dem LHRH-Antagonisten Cetrorelix in Tumorzelllinien	87
3.7. Regulation der EGF-induzierten Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptors durch LHRH-Analoga in Tumorzelllinien	88
3.7.1. Regulation der EGF-induzierten Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptors durch LHRH-Analoga	89

4. Diskussion	91
5. Zusammenfassung	103
6. Literatur	106
7. Danksagung	131
8. Publikationen	133

1. Einleitung

1.1. *Das Ovarialkarzinom*

1.1.1. Epidemiologie und Ätiologie

Eine der häufigsten Krebstodesursachen der Frau ist heute immer noch das Ovarialkarzinom. Obwohl die Tumoren des Ovars insgesamt nur 4 % der malignen Erkrankungen bei Frauen ausmachen und als dritthäufigste Genitalmalignome (10-25 %) in Erscheinung treten, sind sie die vierthäufigste auf Krebs zurückzuführende Todesursache im weiblichen Geschlecht. Sie sind prognostisch das ungünstigste Genitalkarzinom und nach dem Mammakarzinom die häufigste Ursache für Todesfälle, die auf Malignome des weiblichen Genitaltraktes zurückzuführen sind (Parazzini et al. 1991a, Orlandi et al. 1988). In den industrialisierten Ländern Europas und der USA kommt es jährlich zu etwa 15 Neuerkrankungen pro 100.000 Frauen, wobei die Inzidenz konstant, aber nur langsam zunimmt. In Ländern mit bisher niedriger Inzidenz (Japan, Indien) erhöhen sich die Erkrankungsraten. Die Wahrscheinlichkeit für eine Frau, im Laufe ihres Lebens ein Ovarialkarzinom zu entwickeln, liegt bei 1:70, und die Wahrscheinlichkeit an dieser Erkrankung zu sterben beträgt 1:100 (Schmidt-Matthiesen und Bastert 1995).

Eine Prognose für die Patientinnen zu erstellen ist schwierig, da mehr als 70 % der Ovarialkarzinome erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert werden, in dem die 5-Jahres-Überlebensraten nach wie vor schlecht sind. Faktoren für die Prognose sind der Grad der Differenzierung und der histologische Subtyp des Tumors (Ozols et al. 1980, De Souza und Friedlander 1992), die Tumorausbreitung (Shimizu und Haszumi 1992), der Ploidiegrad (Lage et al. 1992, Schueler et al. 1993), das Residualvolumen nach operativem Eingriff sowie das Alter und der Allgemeinzustand der Patientinnen. Letztere Faktoren limitieren die Möglichkeiten der Chemotherapie (Rodenburg et al. 1987, De Souza und Friedlander 1992, Schueler et al. 1993). Die Inzidenz der ovarialen Krebserkrankungen steigt mit zunehmendem Alter der Frauen, wobei das Durchschnittsalter bei 58-65 Jahre liegt. Da charakteristische Symptome nicht auftreten und geeignete Methoden zur Früherkennung nicht zur Verfügung stehen, werden 70 % der Fälle erst im fortgeschrittenen Stadium erkannt. In den Überlebensraten spiegelt sich die hohe Letalität des Ovarialkarzinoms wieder: nur 5-15 % der

Frauen mit fortgeschrittener Erkrankung (FIGO Stadium III und IV) überleben fünf Jahre oder länger. Demgegenüber variieren die 5-Jahres-Überlebensraten der anderen Stadien zwischen 45 % für Stadium II bis zu 72 % für das Stadium Ia (FIGO Annual Report 1985). Eine Gesamtüberlebensrate über alle Stadien beträgt 20-30 % (Schmidt-Matthiesen und Bastert 1995). Die aktuellen Behandlungskonzepte (aggressive Chirurgie, moderne Chemotherapeutika wie Platinderivate und Taxane) ermöglichen eine deutliche Erhöhung der Responderaten und eine Verlängerung des mittleren Überlebens. Echte Heilungen sind jedoch weiterhin seltene Ergebnisse (zur Übersicht: Emons et al. 1993, Emons und Schulz 1995, Emons et al. 1996a, 1996b).

Faktoren, die zur Entwicklung eines Ovarialkarzinoms führen können, werden kontrovers diskutiert. Hierzu gehören familiäre Disposition, Adipositas und insbesondere hormonelle Einflüsse. So scheinen beispielsweise von den während der Ovulation erhöhten Östrogenspiegeln in der Follikelflüssigkeit mitogene Stimuli auszugehen (Godwin et al. 1993). Der überwiegende Teil der Untersuchungen seit 1970 zeigt einen Zusammenhang zwischen der Anzahl der Schwangerschaften bzw. der Einnahme oraler Kontrazeptiva und dem Auftreten eines Ovarialkarzinoms (Fathalla 1971, Casagrande 1979, Lee et al. 1987, Kvale et al. 1988). Als besonderer Risikofaktor wird die Kinderlosigkeit diskutiert. Bei Nulliparae und bei Frauen ohne längerfristige Einnahme von Ovulationshemmern wurde eine erhöhte Inzidenz gefunden. Das Risiko für Frauen mit drei oder mehr Geburten verringert sich gegenüber kinderlosen Frauen um 50 % (Rao und Slotman 1991). Auf dieser Beobachtung basiert die Hypothese, daß die Anzahl der Ovulationen und die dadurch bedingte Ruptur und der Heilungsvorgang des Zölomepithels, die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung eines Ovarialtumors ansteigen läßt. Ein Zusammenhang mit dem Alter beim Einsetzen der Menopause ist bisher nicht direkt nachgewiesen und wird kontrovers diskutiert (Parazzini et al. 1991a). Whittemore et al. (1989) vertreten die Auffassung, daß endokrine Störungen, die mit Sterilität einhergehen, das Risiko für die Entwicklung eines Ovarialkarzinoms erhöhen, da die durch eine Schwangerschaft induzierte Ruhigstellung der Ovarien verhindert wird. Eine genetische Risikokonstellation für die Entstehung von Ovarialkarzinomen wurde durch mehrere Studien nachgewiesen. Von einer familiären Häufung des Ovarialkarzinoms sind wahrscheinlich weniger als 0,05 % aller Frauen betroffen (Oram et al. 1990, Piver et al. 1991), wobei die Anlage zur Entwicklung des Tumors dann autosomal weitergegeben wird.

1.1.2. Histologie und Stadieneinteilung

Die gewebliche Zusammensetzung des Ovars ist komplex. Es besteht aus Coelomepithel, gonadalem Stroma, mesenchymalen Zellen und aus Keimzellen. Etwa 70 % aller Ovarialtumoren entwickeln sich aus dem Oberflächenepithel. Die weiteren Ovarialneoplasien entstehen aus den Keimzellen (15-25 %) und aus dem Ovarialstroma (6 %). Eine Gewebs-Heterogenität innerhalb des gleichen Tumors mit Koexistenz von mehr als einem Zelltyp wird allerdings häufiger beobachtet (Pfleiderer 1989). Ovarialtumoren zeigen einen unterschiedlichen histologischen Aufbau und ein vielfältiges biologisches Verhalten. Eine derzeitige Klassifizierung erfolgt nach den Richtlinien der World Health Organization (WHO; Serov and Scully 1973) und teilt die Ovarialtumoren nach ihrer vermuteten Histogenese ein. Die epithelialen Tumoren werden histologisch in benigne Tumoren, Karzinome mit niedrigem Malignitätsgrad und Karzinome unterschieden. Außerdem teilt man sie entsprechend ihrer histologischen Differenzierungsformen in papillär-seröse (40-45 %), muzinöse (10 %), endometroide (10-20 %), hellzellige (5-10 %) und unklassifizierbare Karzinome ein. Die häufigsten Erscheinungsformen der Keimzelltumoren sind Dysgerminome und Dermoidzysten. Die Tumoren des Ovarialstromas gliedern sich in Granulosazelltumoren, Arrhenoblastome, Thekazelltumoren, Fibrome und Sarkome.

Das histologische Grading bei den epithelialen Tumoren richtet sich nach der zellulären Differenzierung. Die Grade 1 - 3 bezeichnen dabei Karzinome, die histologisch mäßig oder schlecht differenziert sind. Ausschließlich papilläre Strukturen sind typisch für Grad 1-Tumoren, während sich bei Grad 2-Tumoren bereits Areale mit atypischen Zellformen und gesteigerter mitotischer Aktivität finden. Weitere Bereiche undifferenzierter Zellen finden sich bei Grad 3-Tumoren (Ozols et al. 1992).

Eine klinische Stadieneinteilung beruht auf den Kriterien der Internationalen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (FIGO; Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique) und basiert auf der durch Operation und histologische Untersuchung bestimmten anatomischen Ausbreitung. Diese chirurgisch/histologische Einteilung neben der Klassifizierung des histologischen Typs des Karzinoms ist notwendig, da eine Prognose und Therapie der Erkrankung unmittelbar von dem pathologisch-anatomischen Befund abhängig ist. Die nachfolgende Tabelle Tab. I-1 zeigt die Stadieneinteilung nach der FIGO in der revidierten Form von 1986.

Tab. I-1: Stadien primärer Karzinome des Ovars nach Kriterien der FIGO (1986)

Stadium I	Der Tumor ist auf eines oder beide Ovarien beschränkt.
Ia	Der Tumor ist auf ein Ovar beschränkt; kein Aszites. Kein Tumor auf der äußeren Oberfläche. Kapsel intakt.
Ib	Der Tumor ist auf beide Ovarien beschränkt, kein Aszites. Kein Tumor auf der äußeren Oberfläche. Kapsel intakt.
Ic	Tumor im Stadium Ia oder Ib mit der Ausdehnung auf die äußere Oberfläche eines oder beider Ovarien und/oder rupturierter Kapsel. Aszites enthält maligne Zellen oder solche werden bei Peritonealspülungen gefunden.
Stadium II	Der Tumor hat eines oder beide Ovarien überschritten und dehnt sich im Becken aus.
Ila	Tumor mit Ausdehnung und/oder Metastasen zum Uterus und/oder einer der beiden Tuben.
Ilb	Tumorausbreitung in anderen Geweben des Beckens und/oder des viszerale Peritoneums, kein Aszites.
Ilc	Tumor im Stadium Ila oder Ilb ; Aszites enthält maligne Zellen oder solche werden bei Peritonealspülungen gefunden.
Stadium III	Der Tumor hat eines oder beide Ovarien überschritten. Histologisch nachweisbare Metastasen außerhalb des kleinen Beckens und/oder positive retroperitoneale Lymphknoten
IIIa	Histologisch gesicherte Mikrometastasen auf der Oberfläche des Peritoneums außerhalb des kleinen Beckens. Lymphknoten negativ
IIIb	Histologisch gesicherte Metastasen auf der Oberfläche des Peritoneums, nicht größer als 2 cm im Durchmesser. Lymphknoten negativ.
IIIc	Größere abdominale Metastasen und/oder positive retroperitoneale oder inguinale Lymphknoten.
Stadium IV	Befall eines oder beider Ovarien mit Fernmetastasen.

1.1.3. Therapie der Ovarialkarzinome

Eine Behandlung der Ovarialkarzinome beruht im Wesentlichen auf einer möglichst radikalen chirurgischen Tumorreduktion mit anschließender Chemo- und/oder Strahlentherapie. Endokrine Therapien haben in den letzten Jahren stark an Bedeutung gewonnen und sind zu einer unterstützenden Maßnahme in der Behandlung von Ovarialkarzinomen geworden.

1.1.3.1. Operative Therapie

Am Anfang der Therapie des Ovarialkarzinoms steht immer die Operation, die dabei gleichermaßen diagnostische und therapeutische Maßnahme ist, denn nur so kann ein genaues Tumor-Staging vorgenommen werden. Das Ziel des Eingriffs ist es, das Tumorgewebe möglichst vollständig zu entfernen, da eine echte Heilung nur dann erzielt werden kann, wenn vor dem Beginn einer nachfolgenden Chemotherapie keine Tumormassen mehr vorhanden sind (Ozols et al. 1992).

Von wenigen Ausnahmen abgesehen, werden bei dem heute typischen radikalen Vorgehen grundsätzlich beide Ovarien entfernt, auch wenn sich der Tumor auf ein Ovar beschränkt. Unumgänglich ist dabei die Extirpation des Uterus. Das Omentum majus wird auch bei unverdächtigem klinischen Befund entfernt, da es häufig Sitz von Mikrometastasen ist (Pfleiderer 1989). Vielfach wird heute auch die Entfernung der pelvinen und paraaortalen Lymphknoten bis zum Nierenstiel sowie die Resektion des Beckenperitoneums empfohlen (Burghardt et al. 1990, Burghardt et al. 1991). Ist das Karzinom bereits im kleinen Becken oder gar über das gesamte Abdomen ausgebreitet, wird versucht möglichst alle Tumorreste quantitativ zu reseziieren. Zumindest sollte angestrebt werden die Tumormassen operativ soweit als möglich zu verkleinern (operative Zytoreduktion). Von dem größten zurückbleibenden Tumorrest hängt dann die weitere Prognose ab (Hand et al. 1993, Hoskins 1993, Rubin 1992). Bei Patientinnen, die nach einer Chemo- und/oder Strahlentherapie klinisch frei von ihrer Tumorerkrankung erscheinen, kann schließlich explorativ eine Second-Look-Laparotomie erfolgen. Diese zweite Operation folgt den gleichen Prinzipien wie der erste chirurgische und dient der Erhebung des Tumorstatus und der eventuellen Entfernung restlicher Tumormassen.

1.1.3.2. Chemotherapie

Die Chemotherapie gilt als eine der wirksamsten und wichtigsten Behandlungsmaßnahmen beim Ovarialkarzinom, wobei sich die Tumoren mittelgradig sensitiv gegenüber einer Chemotherapie verhalten. Einen positiven Einfluß auf die Überlebenszeiten haben dabei in erster Linie die Remissionen des Tumorgewebes. Die Reduktion des Residualvolumens des Tumors auf eine Größe von maximal 2,0 cm verspricht erheblich bessere Erfolge bei einer anschließenden Chemotherapie als größere postoperative Tumorreste. Die Wahl des Zytostatikums orientiert sich dabei an der Chemosensibilität des jeweiligen Tumors sowie an der individuellen Verfassung und Belastbarkeit der Patientin. Als Chemotherapeutika werden Kombinationen aus Cisplatin bzw. Carboplatin und Cyclophosphamid oder Adriamycin (pauschal 70 % Remission) sowie Hexamethylmelamin (Pfleiderer 1989) und neuerdings Taxane eingesetzt. Die Remissionszeiten sind jedoch oft gering und die Überlebenszeiten trotz des anfänglichen Erfolgs kurz. Außerdem ist bei der Chemotherapie mit einer erheblichen und ebenso akuten Toxizität zu rechnen. Ebenso sollten auch die längerfristigen Folgen (erhöhtes Leukämierisiko, zytostatikabedingte Knochenmarksaplasie) bedacht werden (Cheruku et al. 1993, Colon-Otero et al. 1993).

1.1.3.3. Strahlentherapie

Die Entwicklung der modernen Chemotherapie und die für die Strahlentherapie meist ungünstigen, räumlich ausgedehnten Befunde haben die strahlentherapeutischen Maßnahmen beim Ovarialkarzinom fast vollständig verdrängt. Aber, weil man immer wieder an die Grenzen der chemotherapeutischen Möglichkeiten gelangt, findet die Strahlentherapie alleine oder in Kombination mit einer Chemotherapie auch heute vereinzelt wieder Anwendung, wobei das individuelle Befinden der Patientin die Anwendung dieser Therapie begrenzt (Thomas und Demo 1993, Pfleiderer 1989).

1.1.3.4. Endokrine Therapie

Endokrine Therapieansätze bei der Behandlung von Ovarialkarzinomen scheinen in den letzten Jahren immer wichtiger zu werden, da die üblichen Therapiestrategien (radikale Tumoresektion und anschließende Polychemotherapie) nur bescheidene Langzeitergebnisse erzielen und die Häufigkeit von primären Progressionen und Rezidiven unverhältnismäßig

hoch ist. Sie erscheinen auch deshalb so wichtig, weil eingehende Untersuchungen ergaben, daß Ovarialkarzinome Rezeptoren für Steroid-, Proteo- und Peptidhormone aufweisen. Etwa 60 % der Ovarialkarzinome enthalten Östrogenrezeptoren, 50 % Progesteronrezeptoren und 69 % Androgenrezeptoren (Rao und Slotman 1991). In 36 % der Ovarialkarzinome wurden sowohl Östrogen- als auch Progesteronrezeptoren gefunden, während lediglich 25 % der Tumoren weder Östrogen- noch Progesteronrezeptoren und 12 % nur Progesteronrezeptoren und keine Östrogenrezeptoren enthielten. Da man bei Mammakarzinomen ein vergleichbares Vorkommen und eine ähnliche Verteilung der Steroidrezeptoren findet und dort die endokrine Therapie einen festen Platz einnimmt, kann auch die endokrine Therapie beim Ovarialkarzinom heute einen guten Therapieansatz bilden. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse wurden zahlreiche Versuche unternommen, durch Steroide und/oder mit auf die jeweiligen Rezeptoren abzielenden Antihormonen das Wachstum von Ovarialkarzinomen zu manipulieren (zur Übersicht: Rao und Slotman 1991, Emons et al. 1993a), wobei in den meisten Studien die Wirksamkeit von Antiöstrogenen, Gestagenen oder Östrogen-Gestagen-Kombinationen untersucht wurden. Die Wirksamkeit des Antiöstrogens Tamoxifen wurde in mehreren Arbeitsgruppen untersucht, wobei im Durchschnitt Remissionsraten von 10 % erzielt wurden (Hatch et al. 1991). Der Einsatz von Gestagenen an Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom erzielte nur unwesentlich bessere Ergebnisse (Remissionsraten 15 %, zur Übersicht: Rao und Slotman 1991, Emons et al. 1993a). Hochdosierte Gestagene tragen unabhängig von ihrer Wirkung auf den Tumor dazu bei, den Allgemeinzustand der Patientinnen zu verbessern, aufgrund ihrer starken Nebenwirkungen ist ihr Einsatz allerdings begrenzt (Schmidt-Rhode 1991). Eine Therapie-Kombination von Östrogen und Progesteron - basierend auf der Grundlage, daß Östrogene in Ovarialkarzinomen Progesteronrezeptoren induzieren können - erreichte in einer Studie von Freedmann et al. (1986) eine objektive Remission in 14 % der Fälle, während sich bei 13 % der Frauen die Krankheit stabilisierte. Eine Untersuchung mit der Kombination von Gestagen und Tamoxifen (induziert ebenfalls Progesteronrezeptoren) erbrachte keine objektiven Remissionen. Ebenso zeigten Aromatasehemmer wie Aminogluthemid (Rothschild et al. 1987) und das Androgen Fluoxymestron (Kavanagh et al. 1987) keine Wirkung.

In mehreren Untersuchungen wurde die Existenz von Gonadotropinrezeptoren und eine spezifische Gonadotropinbindung im Tumorgewebe nachgewiesen und ferner gezeigt, daß die Proliferation in vitro durch Gonadotropine stimuliert werden kann (zur Übersicht Emons et al. 1992a, 1992b, Emons und Schally 1994). Auch im Tiermodell zeigte sich in experimentellen Ovarialtumoren und heterotransplantierten menschlichen Ovarialkarzinomen eindeutig eine

Gonadotropinabhängigkeit im Wachstum der Ovarialtumoren (zur Übersicht: Emons et al. 1992a, 1992b). In der Folge beschrieben mehrere Autoren, daß die Suppression der endogenen LH- und FSH-Spiegel durch LHRH-Analoga bei 10-50 % der Patientinnen mit fortgeschrittenem, rezidiertem Ovarialkarzinom zur Remission (partiell, in wenigen Fällen sogar komplett) oder zur Stable-disease führen kann (Bruckner und Motwani 1989, Jäger et al. 1989, Parma et al. 1989, Kavanagh et al. 1989, Lind et al. 1992 und zur Übersicht: Emons et al. 1992a).

In rund 80 % der Ovarialtumoren konnten spezifische Bindungsstellen für LHRH nachgewiesen werden (Emons et al. 1989, Pahwa et al. 1989). In der Folge wurden die Einflüsse sogenannter LHRH-Analoga auf die Proliferation von Ovarialkarzinomen untersucht. Diese Untersuchungen werden in einem späteren Kapitel (1.4.3.) gesondert vorgestellt, da sich diese Arbeit unter anderem speziell mit der Bedeutung dieses Hormons und dessen Rezeptoren auch im Hinblick auf die Möglichkeiten zur Manipulation von Ovarial- und Endometriumkarzinomen beschäftigt.

1.2. Das Endometriumkarzinom

1.2.1. Epidemiologie und Ätiologie

Das Korpus- oder Endometriumkarzinom repräsentiert mit einem Anteil von etwa 10 % aller malignen Erkrankungen der Frau je nach Land das zweithäufigste oder häufigste weibliche Genitalkarzinom (Onnis et al. 1993). Als Todesursache durch Krebs bei Frauen rangiert es an siebter Stelle, und trotz moderner operativer und strahlentherapeutischer Maßnahmen sterben über 30 % der erkrankten Frauen an diesem Karzinom. In den letzten Jahren wird eine allgemeine Zunahme der Inzidenz registriert, wobei die USA und Kanada die Länder mit dem höchsten Risiko darstellen. Demgegenüber liegen die Erkrankungsraten in Entwicklungsländern und Japan um das Vier- bis Fünffache niedriger. Deutschland und die Schweiz weisen in Europa die höchsten Erkrankungsraten auf. Weltweit werden jährlich etwa 150.000 neue Fälle diagnostiziert, wobei auffällt, daß das Endometriumkarzinom eine typische Erkrankung westlicher prosperierender Gesellschaften ist (Parkin et al. 1989, Parazzini et al. 1991b). Derzeit wird bei der Inzidenz des Endometriumkarzinoms in den Industrieländern ein kontinuierlicher Anstieg beobachtet, der fast die Häufigkeit des

Zervixkarzinoms erreicht (Onnis et al. 1993). Da das Endometriumkarzinom vorwiegend eine Erkrankung älterer Frauen ist, spielt hier sicherlich auch die in den letzten Jahrzehnten deutlich angestiegene Lebenserwartung eine Rolle. Es entwickelt sich überwiegend bei älteren Frauen, wobei der Erkrankungsgipfel zwischen dem 60. und 65. Lebensjahr liegt. Die größte Anzahl der Frauen ist im Klimakterium und in der Postmenopause, etwa 10-25 % erkranken bereits in der Prämenopause, während nur 2-5 % der Patientinnen jünger als 40 Jahre sind (Schmidt-Matthiesen und Bastert 1995).

Gegenüber dem Ovarialkarzinom ist die Prognose für Patientinnen mit dem Endometriumkarzinom relativ günstig, da etwa 70 % der Erkrankungen bereits im FIGO-Stadium I erkannt werden und damit eine 5-Jahres-Überlebensrate von 74 % verbunden ist (Pettersson 1988). Das klassische Leitsymptom ist dabei eine Blutungsstörung, insbesondere die Blutung in der Postmenopause, aber auch Zwischenblutungen und prä- oder postmenstruellen Schmierblutungen bei Frauen über 35 Jahren. Zum Zeitpunkt einer darauffolgenden Diagnosestellung ist in 70 % der Fälle das Karzinom auf das Corpus uteri beschränkt. Wird ein Endometriumkarzinom in einem späteren Stadium diagnostiziert, und/oder ist bereits eine extrauterine Aussaat von Tumormaterial erfolgt, steigt die Letalität rapide an. Die 5-Jahres-Überlebensraten liegen bei einem Endometriumkarzinom im Stadium II bei 58 %, im Stadium III bei 43 % und im Stadium IV nur noch bei lediglich 8 % (Pettersson 1988).

Die ätiologischen Faktoren werden klar dominiert von einer langandauernden Östrogeneinwirkung auf das Endometrium. Vergesellschaftet mit einem fehlenden Progesteroneinfluß auf die Gebärmutter Schleimhaut, kann es zum Auftreten unterschiedlicher Formen einer Endometriumhyperplasie führen, die wiederum in ein Endometriumkarzinom einmünden kann. Vor diesem Hintergrund werden auch Amenorrhö und irreguläre menstruelle Zyklen als Risikofaktor betrachtet (Parazzini et al. 1991b). Weitere Studien stellen einen direkten Bezug zwischen der Einnahme von reinen Östrogenpräparaten in der Peri- und Postmenopause und der Entwicklung eines Endometriumkarzinoms her (Parazzini et al. 1991b). Es wurde ein bis zu zwölfmal erhöhtes Risiko für die Entstehung eines Endometriumkarzinoms ermittelt, wobei die Größe dieses Risikos proportional zu der Dauer und Dosis der Östrogenzufuhr ist (Jelovsek et al. 1989). Im Gegensatz dazu stehen Untersuchungen, die keinen eindeutigen Kausalzusammenhang zwischen Östrogeneinnahme und dem Auftreten eines Endometriumkarzinoms feststellen (Silverberg 1984). Aus diesem Grund unterscheidet man zwischen zwei pathogenetisch unterschiedlichen Karzinomtypen. Der Typ A ist charakterisiert durch Diabetes, Infertilität und Hyperlipidämie. Das

Tumorgewebe zeichnet sich durch einen hohen Progesteron- und Östrogenrezeptorgehalt aus und dem Karzinom gehen Hyperplasie und meist eine Langzeitöstrogenzufuhr voraus, wodurch die Prognose für diesen Karzinomtyp sehr gut ist. Der Typ B weist diese Kennzeichen nicht auf. Statt dessen ist er charakterisiert durch einen geringen Gehalt an Progesteronrezeptoren und ein entdifferenziertes, tief invasives und metastasierendes Karzinom mit einer sehr ungünstigen Prognose (Pfleiderer 1991).

1.2.2. Histologie und Stadieneinteilung

Während der Geschlechtsreife unterliegt das Endometrium einem regelmäßigen Auf- und Abbau. Aufgrund ovarieller Dysfunktion kommt es in den letzten Jahren vor der Menopause zu überschießenden Proliferationen des Endometriums, denen bei bestimmter Ausprägung im Klimakterium besondere prognostische Bedeutung zukommen. Um die Schwierigkeiten in der Abgrenzung einzelner Hyperplasieformen untereinander und in einem reifen Endometriumkarzinom zu vermeiden, haben die Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe) und die Sektion Gynäko-Pathologie (Deutsche Gesellschaft für Pathologie) in Anlehnung an die WHO-Richtlinien eine international abgesicherte Nomenklatur der Präkanzerosen und der Karzinome des Endometriums für den deutschsprachigen Raum erarbeitet und zur allgemeinen Benutzung empfohlen (Dallenbach-Hellweg und Schmidt-Matthiesen 1984). Die typische Präkanzerose des Endometriumkarzinoms ist die adenomatöse Hyperplasie. Diese wird in drei Schweregrade (Grade I – III) eingeteilt, wobei die Abgrenzung einer atypischen Hyperplasie (adenomatöse Hyperplasie Grade III) von einem hoch differenzierten Endometriumkarzinom sehr schwierig sein kann. Bei den Endometriumkarzinomen handelt es sich hauptsächlich um Adenokarzinome (60 %). Weiterhin unterscheidet man Adenokankroid (20 %), adenosquamöse Karzinome (7 %), serös-papilläre Karzinome (5-10 %), Klarzellkarzinome (6 %) und das sehr seltene sekretorische Karzinom. Darüber hinaus wird neben dieser histopathologischen Typisierung auch eine Zuordnung der Karzinome aufgrund ihrer verschiedenen Differenzierungsgrade vorgenommen. Dabei unterscheidet man gut differenzierte (Grad 1), mäßig differenzierte (Grad 2) und schlecht differenzierte bzw. undifferenzierte Karzinome (Grad 3). Mit abnehmender Differenzierung sinkt der Östrogen- und Progesteronrezeptorgehalt, die DNA-Diploidie geht zunehmend in Aneuploidie über und die Aggressivität des Tumors steigt an (Baltzer und Maaßen 1989). Die klinische Stadieneinteilung beruht genauso wie bei dem Endometriumkarzinom auf den Kriterien der

FIGO und basiert seit 1988 ausschließlich auf dem postoperativen Status und der histologischen Untersuchung (vgl. Tab. I-2).

Tab. I-2: Stadieneinteilung des Endometriumkarzinoms nach Kriterien der FIGO (1988)

Stadium I	
Ia	Der Tumor ist auf das Endometrium beschränkt
Ib	Invasion des Tumors bis zu 50 % der Myometriumdicke
Ic	Invasion des Tumors über 50 % der Myometriumdicke
Stadium II	
	Befall der Zervix uteri
IIa	Der Tumor ist auf endozervikale Drüsen beschränkt
IIb	Invasion des Tumors in das Stroma der Zervix
Stadium III	
IIIa	Befall der Uterus – Serosa und/oder Befall der Adnexe und/oder positive Peritonealzytologie
IIIb	Befall der Vagina
IIIc	Befall der pelvinen und/oder paraaortalen Lymphknoten
Stadium IV	
IVa	Invasion des Tumors in die Blase und oder Darmmukosa
IVb	Fernmetastasen einschließlich intraabdominaler Metastasen und/oder Leistenlymphknoten

1.2.3. Therapie der Endometriumkarzinome

Für die Primärtherapie des Endometriumkarzinoms stehen verschieden Konzepte zur Auswahl, wobei sich der Therapieansatz nach der Ausdehnung und Differenzierung des Karzinoms, dem Lymphknotenstatus, dem Zustand der Patientin und weiteren

Prognosefaktoren richtet. Abgesehen von wenigen relativ seltenen und weit fortgeschrittenen Fällen, steht primär die operative Behandlung (Fuchtnet et al. 1993) kombiniert mit einer prä- oder postoperativen Strahlentherapie im Vordergrund. Diese Kombination verspricht eine 10-20 %ige Verbesserung des Heilungsergebnisses (Hacker 1991, Schulz 1991).

1.2.3.1. Operative Therapie

Bei Patientinnen mit sogenannten low-risk-Tumoren ist die Totalexstirpation des Uterus unter Mitnahme der Adnexe die typische Vorgehensweise des Operators. Bei ungünstigeren Prognosen (high-risk-Tumoren: disseminierte, invasiv wachsende Tumoren) wird zusätzlich eine Ektomie der pelvinen und paraaortalen Lymphknoten empfohlen (Pfleiderer 1991).

1.2.3.2. Chemotherapie

Endometriumkarzinome reagieren in der Regel wenig sensitiv auf eine Therapie mit Zytostatika. Bei Frauen mit einem fortgeschrittenen oder metastasiertem, disseminiertem Karzinom kann, wenn es sich um Progesteronrezeptor-negative undifferenzierte Tumoren handelt, die nicht auf eine Gestagentherapie ansprechen, eine Chemotherapie indiziert werden. In der Monotherapie sind Cisplatin (19-38 % Ansprechrates) und Doxorubicin (4-42 % Ansprechrates) die potentesten Chemotherapeutika. Durch Kombinationen von Cyclophosphamid, Doxorubicin und Cisplatin werden Responseraten von bis zu 81 % erzielt. Die Überlebensraten betragen trotzdem nur weniger als 12 Monate, da die Remissionen oft nur partiell und von kurzer Dauer sind (Park et al. 1992). Die konventionelle Strategie (Operation und Strahlentherapie) ist deshalb chemotherapeutischen Maßnahmen überlegen, weil schwere Nebenwirkungen und typische internistische Begleiterkrankungen bei den vorwiegend älteren Patientinnen die Therapie negativ belasten oder sogar zum Therapieabbruch zwingen (Park et al. 1992).

1.2.3.3. Strahlentherapie

Eine Strahlentherapie als Indikation ist nur dann gegeben, wenn eine operative Behandlung nicht durchführbar ist, was allerdings die Prognose verschlechtert und die Morbidität erhöht.

Bei der Strahlentherapie wird eine kombinierte Therapie aus mehrmaliger intrakorporaler Einlage von Radium- oder Radiokobaltträgern (intrauterine Kontakttherapie, Pack-Methode) oder anderen Radionukliden (Afterloading) mit perkutaner Hochvoltbestrahlung durchgeführt (Baltzer und Maaßen 1991). Als adjuvante postoperative Maßnahme wird die Radiotherapie im Wesentlichen in Form der intravaginalen Kontaktbestrahlung angewendet (Vergote et al. 1991). Rezidive in der Scheide und im kleinen Becken können durch diese postoperative Bestrahlung deutlich reduziert werden (Piver et al. 1991). Bei fortgeschrittenen Stadien (>1c) wird zusätzlich die perkutane Bestrahlung des kleinen Beckens und gegebenenfalls die der paraaortalen Lymphknoten empfohlen (Park et al. 1992).

1.2.3.4. Endokrine Therapie

Der Einfluß auf das Wachstum von hormonsensitiven Endometriumkarzinomen durch Östrogen und Progesteron ist hinlänglich bekannt (zur Übersicht: Schulz und Emons 1995). Seit langem werden dabei Gestagene eingesetzt, um die Proliferation steroidabhängiger Tumoren zu antagonisieren. Voraussetzung einer Therapie ist dabei in erster Linie der Rezeptorstatus des Karzinoms, da progesteronrezeptor-negative Tumoren kaum auf Gestagene ansprechen. Ist der Progesteron-Rezeptorstatus jedoch positiv, so wird bei etwa 70 % der Patientinnen der Allgemeinzustand verbessert und eine Tumorremission vorübergehend oder anhaltend bei 10-30 % der Fälle erreicht (Schulz et al. 1991, Park et al. 1992, Schulz und Emons 1995). Der Nachweis von Östrogenrezeptoren verbessert die Prognose gegenüber rezeptor-negativen Patientinnen nicht (Kleine 1991). Außerdem besteht ein direkter Zusammenhang zwischen dem Steroidrezeptorgehalt und dem Differenzierungsgrad des Karzinoms: mit fortschreitender Entdifferenzierung nimmt der Rezeptorgehalt und damit die Ansprechrate auf eine Gestagentherapie ab (zur Übersicht Schulz und Emons 1995, Kleine 1991). Hat sich so der Gestageneffekt erschöpft, kann die zusätzliche Gabe des Antiöstrogens Tamoxifen Erfolg haben. Eine Wirksamkeit von Androgenen auf Endometriumkarzinome konnte nicht nachgewiesen werden (Schulz et al. 1991, Boman et al. 1993).

Erwähnenswert sind auch hoffnungsvolle Ansätze, die sich auf eine nebenwirkungsarme Therapie mit Luteinisierenden Hormon-Releasing Hormon-Agonisten und –Antagonisten beziehen (Emons et al. 1993a, Kullander 1992). Diesen Therapieansatz unterstützen die Ergebnisse, daß in 77 % der untersuchten Endometriumkarzinome bei Pahwa et al. (1991) Bindungsstellen für das Luteinisierende Hormon-Releasing Hormon gefunden werden

konnten. Aufgrund der wenigen klinischen Daten bei der Anwendung der LHRH-Analoga bei Behandlung des Endometriumkarzinoms werden die aktuellen Ergebnisse in 1.4.3. referiert.

1.3. Molekulare Grundlagen der Krebsentstehung

Die grundlegenden Mechanismen, die das unkontrollierte Wachstum von malignen Zellen auslösen, sind auch heute noch nicht vollständig verstanden. Die meisten Autoren gehen davon aus, daß die Ursachen für die Krebsentstehung in angeborenen oder erworbenen Genabnormalitäten liegen. Unmittelbar daran beteiligt sind zwei entscheidende Kategorien von Genen: die Proto-Onkogene (Berchuck et al. 1992, Bast et al. 1993, Godwin et al. 1993) und die Tumorsuppressor-Gene, die direkt an der Tumorgenese und an der Tumorprogression beteiligt sind (Bishop 1991, Marshall 1991).

Die Proto-Onkogene codieren im Wesentlichen normale regulatorische Elemente, die das Wachstum, die Entwicklung und die Differenzierung der Zelle kontrollieren. Durch genetische Veränderungen wie Punktmutationen, Genamplifikationen, Deletionen oder chromosomale Translokationen können Onkogene aktiviert werden und zu neoplastischem Wachstum einer Zelle oder eines Zellverbandes führen. Die Genprodukte der Proto-Onkogene werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Funktion, der zellulären Lokalisation und der Struktur der Proteine in verschiedene Gruppen eingeteilt. Sie umfassen dabei im Einzelnen Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, nukleare Transkriptionsregulatoren sowie intrazelluläre Transducer (Proteinkinasen), die das Signal der Wachstumsfaktoren weiterleiten.

Tumorsuppressor-Gene hingegen sind negative Regulatoren im Zellwachstum. Zur Krebsentstehung tragen hier die Inaktivierung oder der Verlust von Genen bei, wobei dieser Vorgang mit einer Mutation in beiden Allelen der Tumorsuppressor-Gene verbunden ist (Godwin et al. 1992).

1.3.1. Onkogene und Tumorsuppressor-Gene beim Ovarial- und Endometriumkarzinom

Allgemein sind Onkogene und Tumorsuppressor-Gene direkt bei der Entstehung eines malignen Phänotyps beteiligt. Auch bei den Ovarial- und Endometriumkarzinomen spielen sie

ein entscheidende Rolle. Speziell die Tyrosinkinasen, zu denen auch die Wachstumsfaktorrezeptoren auf der Zelloberfläche gehören, charakterisieren die größte Familie der Onkogenprodukte. Eines der Onkogene dieser Familie - das HER-2/*neu* Gen (*c-erbB2*) – kodiert ein Zelloberflächenglykoprotein, das große strukturelle Homologien mit dem Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGF-R) aufweist (Yamamoto et al. 1986, Gullick et al. 1987).

In ca. 30 % der Ovarialkarzinomen wird dieses Her-2/*neu* Onkogen überexprimiert (Slamon et al. 1990, Berchuck et al. 1990, Marth et al. 1992), wobei diese Überexpression mit einer schlechten Prognose korreliert. Die Amplifikation dieses Onkogens steht beim Endometriumkarzinom in direkter Beziehung zu Tumorstadium und Differenzierung (Borst et al. 1990).

Ein weiteres Onkogen dieser Familie ist *fms*. Es kodiert für einen membranständigen Tyrosinkinase-Rezeptor, an den der Makrophagen-Kolonie-Stimulierende Faktor (M-CSF) zu binden vermag. Die Expression dieses Onkogens wurde bezüglich des Ovarial- und Endometriumkarzinoms von Kacinski et al. (1988, 1991) beschrieben und zeigt, daß M-CSF häufig von Ovarialkarzinomzelllinien gebildet wird.

Eine weitere Gruppe von zellulären Onkogenprodukten umfaßt die GTP-bindenden Proteine in der Plasmamembran. Dies sind die sogenannten *ras*-Onkogene, deren Genprodukte die G-Proteine sind, die wiederum an der Weiterleitung von Signalen beteiligt sind. Eine Amplifikation von Ha-*ras* und Ki-*ras* konnte bei 2 % beziehungsweise 12 % der Patientinnen mit einem Ovarialtumor nachgewiesen werden (Zhou et al. 1989, Boltz et al. 1989).

Eine andere Familie besteht aus im Zellkern lokalisierten Genprodukten, die häufig als Transkriptionsfaktoren fungieren. Die Amplifikation dieser sogenannten „immediate early genes“ *c-myc* und *c-fos* beim Endometriumkarzinom wurde bei Borst et al. (1990) und Kacinski et al. (1988) beschrieben. Tashiro et al. (1992) fanden beim Ovarialkarzinom in 37 % der untersuchten Gewebe eine Überexpression von *c-myc*.

Das intensivste untersuchte Tumorsuppressor-Gen ist heute das p53-Gen. Bei dessen Genprodukt handelt es sich um ein 53 kDa-Phosphoprotein mit kurzer Halbwertszeit, das an die DNA bindet und als Transkriptionsregulator fungiert (Berchuck et al. 1992). Die in der Tumorgenese häufige Missense-Mutation in den hochkonservierten Bereichen des Gens, zumeist in Kombination mit dem Verlust des Wildtyp-Allels, führt zur Synthese von Proteinen mit einer erhöhten Stabilität gegenüber dem eigentlichen p53. Die daraus resultierende Überexpression des mutierten, jedoch wahrscheinlich inaktiven p53 korreliert bei zahlreichen Neoplasien mit einer malignen Transformation. Mutation und Überexpression des Onkogens p53 wurde in 50 % von daraufhin untersuchten Ovarialkarzinomgeweben

(Marks et al. 1991) und 21 % von Endometriumkarzinomgeweben (Kohler et al. 1992) nachgewiesen.

1.3.2. Wachstumsfaktoren und Peptidhormone bei der Zelltransformation

Neben Onkogenen, Tumor-Supressor-Genen und ihren Produkten existiert noch eine weitere Klasse von Substanzen, die in die Wachstumskontrolle von Ovarial- und Endometriumkarzinomen involviert ist beziehungsweise sein könnte: die Peptidhormone und Wachstumsfaktoren. Unter anderem wird die Teilung, das Wachstum und die Differenzierung von Zellen durch verschiedene Peptidhormone und Wachstumsfaktoren kontrolliert, die sich in zahlreichen Geweben, in der Gewebsflüssigkeit und im Blutstrom befinden (Holley 1975). Die Bedeutung vieler dieser Botenstoffe für die Krebsentstehung und Progression ist intensiv untersucht worden, so etwa die Rolle des Transformierenden Wachstumsfaktors (TGF- α , Berchuck et al. 1990, Stromberg et al. 1992; TGF- β , Berchuck et al. 1990), des Kolonie-stimulierenden Faktors (CSF-1, Kacinski et al. 1991), des Tumor-Nekrose-Faktors (TNF, Naylor et al. 1990) sowie des Interleukin-1 und des Interleukin-6 (Wu et al. 1992).

Die Erkenntnis, daß einige Onkogenprodukte große strukturelle Ähnlichkeit mit bekannten Wachstumsfaktoren oder deren Rezeptoren aufweisen beziehungsweise mit diesen identisch sind, unterstützt die These, daß Wachstumsfaktoren eine Rolle bei der Tumorentwicklung spielen. Die Synthese mitogen wirksamer Peptide durch Tumorzellen wie auch die Produktion von Substanzen, die direkt oder durch Signalübertragungsmechanismen in der Zelle letztendlich eine vermehrte DNA-Synthese zur Folge haben, ist demnach ein wichtiges regulatorisches Prinzip bei der malignen Transformation und Tumorprogression, wobei die Mechanismen, die das unkontrollierte Wachstum maligner Zellen hervorrufen, noch nicht vollends geklärt sind. Auf molekularer Ebene sind verschiedene Systeme der Signalübertragung möglich: die endokrine, die parakrine und die autokrine Regulation. Während bei der endokrinen Sekretion chemischer Botenstoffe über den Blutstrom ihre Zielorte erreichen, werden bei parakrinen oder autokrinen Kontrollmechanismen die Substanzen lokal gebildet und gelangen durch Diffusion im Extrazellularraum zu ihren Zielzellen.

1.3.3. Autokrine Wachstumsstimulation

Lange bekannt ist die Tatsache, daß Krebszellen relativ autonom zu wachsen vermögen. Das bedeutet, daß sie in der Lage sind, sich regulierenden Einflüssen des Gesamtorganismus zu entziehen. Das Phänomen, das maligne entartete Zellen weniger exogene Wachstumsfaktoren benötigen als normale Zellen (Holly 1975), wurde derart erklärt, daß die Transformation von Zellen durch die endogene Produktion von Polypeptid-Wachstumsfaktoren, die über spezifische funktionale Plasmamembran-Rezeptoren auf die Zelle zurückwirken, die sie gebildet hat, erst bewirkt wird (Todaro und DeLarco 1987). Basis dieses Phänomens sind die inzwischen bekannten Mechanismen autokriner Proliferationskontrolle, die auch als „Autokrine Sekretion“ bezeichnet wird (Sporn und Todaro 1980). Dieser Terminus beschreibt die Fähigkeit der Zellen, durch Aktivierung von Onkogenen, die in Wechselwirkung mit entsprechenden Rezeptoren treten, die Unabhängigkeit von exogenen wachstumsregulierenden Substanzen zu erlangen. Bis heute sind zahlreiche Typen von Tumorzellen auf der Basis dieser Hypothese untersucht worden, mit dem Ergebnis, daß verschiedene Substanzen über einen autokrinen Mechanismus in Krebszellen wirken. Darunter sind zu nennen der Transformierende Wachstumsfaktor α (TGF- α , autokrine Wachstumsstimulation), der Transformierende Wachstumsfaktor β (TGF- β , autokrine Wachstumsinhibition), der Thrombozyten-entstammende Wachstumsfaktor (PDGF), der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor (IGF-1), Bombesin und Interleukin-2 (zur Übersicht: Bast et al. 1993, Godwin et al. 1993, Sporn und Roberts 1985).

In Ovarialkarzinomzelllinien konnte eine durch den Transformierenden Wachstumsfaktor α (TGF- α) medierte autokrine Rückkopplungsschleife nachgewiesen werden (Morishige et al. 1991, Stromberg et al. 1992). Hierbei wurde die TGF- α -Sekretion demonstriert und gleichzeitig der Nachweis für die Expression des Rezeptors für TGF- α erbracht, der dem Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGF-Rezeptor) entsprach. Neben einer exogenen Zugabe von TGF- α , das die Zellproliferation stimulierte, konnte gezeigt werden, daß durch Zugabe von spezifischen gegen TGF- α gerichteten Antikörpern das Wachstum inhibiert wird. Yee et al. (1991) fanden in Ovarialkarzinomzellen Komponenten, die für eine autokrine Wachstumsstimulation durch IGF-1 sprechen (Sekretion von IGF-1, spezifische IGF-1-Rezeptoren und Stimulation der Proliferation durch exogenen IGF-1-Zusatz). Eine autokrine Wachstumsstimulation durch den Kolonie-Stimulierenden-Faktor-1 (CSF-1) wird beim Ovarial- und Endometriumkarzinom vermutet (Kacinski et al. 1991).

1.4. Das Luteinisierende Hormon-Releasing Hormon

Bei dem Luteinisierenden Hormon-Releasing Hormon (LHRH, syn. GnRH) handelt es sich um ein hypothalamisches Dekapeptid, dessen Struktur 1971 (Schally et al. 1971; Aminosäuresequenz vgl. Abb. I-2) erstmals charakterisiert wurde. LHRH wird von den Neuronen des Hypothalamus (medialer Nucleus präopticus, Nucleus arcuatus) pulsatil in das hypophysiale Portalvenensystem sezerniert. Diese Freisetzung erfolgt als Reaktion auf neurale und neuroendokrine Signale des Gehirns, sowie Steroid- und Peptidhormonsignale verschiedener endokriner Organe. Über das Portalvenensystem gelangt das LHRH zum Hypophysenvorderlappen und bindet dort an spezifische Rezeptoren (Abb. I-1) in den Zellmembranen gonadotroper Zellen.

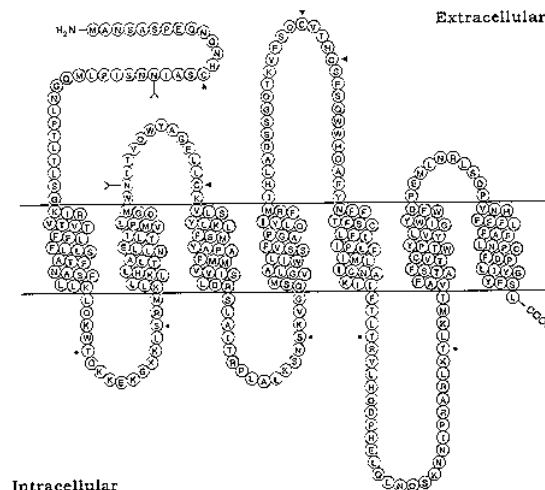


Abb. I-1: Schematische Darstellung des membranständigen LHRH-Rezeptors. Struktur und Topographie des humanen LHRH-Rezeptors. Mögliche Glycosylierungsstellen (Y) und Ansatzpunkte für die Phosphorylierung durch die Proteinkinase C (*) sowie Cysteinreste in extrazellulären Loops (▲) sind entsprechend hervorgehoben (entnommen und verändert: Kakar et al. 1992).

Durch die Bindung an diese Rezeptoren reguliert das LHRH über eine Reaktionskaskade (Übersicht Naor 1990, Stojilkovic et al. 1994) die Synthese und Freisetzung des Luteinisierenden Hormons (LH) und des Follikel-Stimulierenden Hormons (FSH) in den gonadotropen Zellen. Die pulsatile LHRH-Sekretion (Amplitude und Frequenz) korreliert mit einer differenzierten Sekretion von LH und FSH. Durch die induzierte Freigabe dieser

Hormone in den Blutkreislauf kommt es in den Ovarien zur Follikelreifung, zur Ovulation und Bildung des Corpus luteum. Zwischen dem Ovar und der hypothalamisch-hypophysären Achse bestehen verschiedene Rückkopplungsmechanismen. Das Mengenverhältnis der Gonadotropine in Antwort auf den LHRH-Stimulus ist von der Konditionierung der gonadotropen Zellen abhängig, die im wesentlichen durch Estradiol und Progesteron determiniert wird. Das vom heranwachsenden Follikel gebildete Estradiol hemmt zunächst die Sekretion von LHRH und damit auch die von LH und FSH (negatives feedback). Dem entgegen steigern präovulatorische hohe Östrogenkonzentrationen die Ausschüttung von LH (positives feedback) und vermindern die FSH-Sekretion. Mit Erreichen einer bestimmten Schwellenkonzentration von Estradiol erfolgt die Umkehr der Steuerungsvorgänge, wobei eine Simulation der Gonadotropinfreisetzung wirksam wird. LH und FSH induzieren die Ovulation und die Bildung des Corpus luteum. Zusätzlich zu Estradiol wird Progesteron gebildet, daß die stimulierende Wirkung des Estradiols auf die Gonadotropinsekretion aufhebt. Mit dem Einsetzen der Luteolyse sinken die Progesteronwerte und die Stimulation und das Wachstum der Follikel kann erneut erfolgen (Runnebaum und Rabe, 1987).

1.4.1. Mechanismen der LHRH-vermittelten Signaltransduktion

Die Bindung von LHRH und die damit verbundene Aktivierung des hypophysären LHRH-Rezeptors initiiert eine Reihe von Reaktionen, die zu einer Kaskade von intrazellulären Antworten führt (zur Übersicht: Stojilkovic et al. 1994). Der erste Schritt der Reaktionskaskade ist hierbei eine G-Protein vermittelte Aktivierung der Phospholipase C (PLC). Dieses Enzym katalysiert die Hydrolyse des Zellmembranbausteins Phosphatidylinositoldiphosphat, woraus die Abbauprodukte Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) resultieren. Diese initialen Veränderungen determinieren den zweiten Schritt der Signaltransduktion. IP_3 induziert oszillatorische oder biphasische Steigerungen der zytosolischen Calciumkonzentrationen ($[Ca^{2+}]_i$), wodurch unter Mitwirkung von DAG die Protein Kinase C (PKC) aktiviert wird. Nachfolgend wirken ($[Ca^{2+}]_i$) und PKC als interagierende Signale in der Regulation verschiedener zellulärer Reaktionen. Dabei haben sie unter anderem Einfluß auf die Kontrolle des Calciumsignals, sowie der Kontrolle der Expression von primären und sekundären Genen. Weiterhin sind die Signalmoleküle der PLC-abhängigen Reaktionskaskade in positive und negative Kontrollmechanismen des Signaltransduktionsweges involviert.

Diese Rückkopplungsmechanismen erhöhen die Komplexität der Signaltransduktion und spielen eine Rolle bei der Verstärkung, Dauer und Beendigung einzelner Aspekte des Signals. Es wird vermutet, daß solche Mechanismen ebenfalls bei der Desensitivierung der Zellen, die einer kontinuierlich hohen LHRH-Konzentration ausgesetzt sind wirksam sind. Unter bestimmten Bedingungen induziert LHRH einen moderaten Anstieg der zytosolischen Konzentrationen an zyklischen Adenosin- und Guanosinmonophosphat (Liu et al. 1981). Diese zyklischen Nukleotide scheinen jedoch nicht in die akute, LHRH-induzierte Sekretion der Gonadotropine involviert zu sein, spielen aber möglicherweise eine Rolle bei der LHRH-induzierten Gonadotropinsynthese (Naor und Catt 1980, Liu und Jackson, 1981).

Emons et al. (1989) erbrachten den Nachweis, daß Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien den LHRH-Rezeptor exprimieren und durch nanomolare Konzentrationen von LHRH-Analoga gehemmt werden können

Hsieh und Martin (1992) zeigten die Kopplung des LHRH-Rezeptors über ein G-Protein an die Phospholipase C in Ovarialkarzinomen. Ebenso konnten Ohno et al. (1993) die Stimulation der Phospholipase C und die nachfolgende Produktion von Inositolphosphaten in Ovarialkarzinomen nachweisen.

In einigen LHRH-sensitiven soliden Tumoren (z.B. Mammakarzinom, Prostatakarzinom und Pankreaskarzinom), die Tyrosinkinase-assoziierte Onkogene überexprimieren, wurde eine gesteigerte Expression von LHRH-Rezeptoren nachgewiesen (Szende et al. 1990 und 1991, Lee et al. 1991). Diese LHRH-Rezeptoren aktivieren eine Tyrosinphosphatase, die die wachstumstimulierenden Effekte der Tyrosinkinasen antagonisieren können

1.4.2. LHRH-Analoga

Im Anschluß an die Strukturaufklärung des LHRH im Jahre 1971 wurde postuliert, daß durch chemische Änderungen der Aminosäuresequenz des Moleküls sogenannte Hormon-Analoga synthetisiert werden können (Schally et al. 1971), welche die Wirkung des natürlichen Dekapeptids potenzieren (LHRH-Agonisten) oder das körpereigene Hormon kompetitiv von seinem Rezeptor verdrängen, ohne selbst biologisch aktiv zu sein (LHRH-Antagonisten). Seitdem wurden mehr als 3000 solcher agonistischen oder antagonistischen Analoga synthetisiert (Schally et al. 1989, Schally et al. 1993), von denen einige eine erheblich gesteigerte Wirkung im Vergleich zu dem natürlichen Hormon aufweisen. Viele der in den Positionen 6 und/oder 10 substituierten Agonisten zeigen eine 50- bis 100-fach stärkere Aktivität als LHRH selbst, wohingegen die potentesten LHRH-Antagonisten chemische

Veränderungen an den Positionen 1, 2, 3, 5, 6, 7 und 8 aufweisen (zur Übersicht Kutscher et al. 1997). Verschiedene Studien zeigten, daß die Frequenz und die Amplitude der pulsatischen LHRH-Sekretion in direktem Zusammenhang mit der Freisetzung von LH und FSH stehen. Als klinische Indikation führt die kontinuierliche Behandlung mit solchen LHRH-Agonisten und –Antagonisten zu einem Zustand, den man als reversible medikamentöse Kastration bezeichnet. Der zugrunde liegende Mechanismus dieses Effektes ist eine Desensitivierung der gonadotropen Zellen, wobei die Anzahl der LHRH-Rezeptoren verringert wird. Dieser Vorgang wird als Rezeptor-Down-Regulation definiert. Die unphysiologische Dauerstimulation der Hypophysenzellen mit LHRH-Agonisten führt zunächst zu einer stark erhöhten LH- und FSH-Sekretion. Anschließend tritt jedoch durch eine Internalisierung der Rezeptor-Ligand-Komplexe eine extreme Abnahme der LHRH-Rezeptorzahl ein. Die gonadotropen Zellen verhalten sich nun weiteren Stimulationen gegenüber refraktär und die Gonadotropinsekretion kommt vollständig zum Erliegen. Man bezeichnet diesen Zustand als selektive medikamentöse Hypophysektomie. In vergleichbarer Weise werden durch die anfänglich hohen LH- und FSH-Konzentrationen die gonadalen Zellen zusätzlich desensitiviert und die Gonadotropinrezeptoren reduziert. Das Zusammenwirken dieser Vorgänge führt zu einer vollständigen Inhibition der ovariellen Funktionen der Frau.

Abb. I-2: Aminosäuresequenz des nativen LHRH und seiner klinisch relevanten Analoga (Agonisten und Antagonisten).

LHRH	pGlu –His-Trp-Ser-Tyr – Gly – Leu-Arg-Pro-Gly – NH ₂
<u>Agonisten</u>	
Triptorelin	pGlu – – D-Trp ⁶ – – NH ₂
Leuprolide	pGlu – – D-Leu ⁶ – – Ethylamid
Buserelin	pGlu – – D-Ser(Bu ^t) ⁶ – – Ethylamid
Goserelin	pGlu – – D-Ser(Bu ^t) ⁶ – – Az-Gly-NH ₂
Nafarelin	pGlu – – D-Nal(2) ⁶ – – NH ₂
<u>Antagonisten</u>	
Cetrorelix	[Ac-D-Nal(2) ¹ , D-Phe(4Cl) ² , D-Pal(3) ³ , D-Cit ⁶ , D-Ala ¹⁰]LHRH
Antide	[Ac-D-Nal(2) ¹ , D-Phe(4Cl) ² , D-Pal(3) ³ , D-Lys ⁵ , D-Lys ⁸ , D-Ala ¹⁰]LHRH
Ramorelix	[Ac-D-Nal(2) ¹ , D-Phe(4Cl) ² , D-Pal(3) ³ , D-Ser ⁶ , Azagly ¹⁰]LHRH

Vergleichbare Resultate erzielen LHRH-Antagonisten, wobei das Wirkungsprinzip auf der Blockade der hypophysären Rezeptoren beruht. Durch diese kompetitive Hemmung der Rezeptoren wird die Gonadotropinsekretion sofort eingestellt und der Zustand der medikamentösen Kastration ohne Latenzperiode erreicht (zur Übersicht: Schally et al. 1993, Emons und Schally 1994).

1.4.3. LHRH-Analoga bei der endokrinen Manipulation von Ovarial- und Endometriumkarzinomen

Das hypothalamische Luteinisierende Hormon-Releasing Hormone ist ein Schlüsselhormon in der Regulation des reproduktiven Systems von Säugetieren (zur Übersicht: Schally 1994, Stojilkovic und Catt 1995). In den letzten Jahren konnten darüber hinaus überzeugende Beweise dafür gebracht werden, daß LHRH außerdem eine Reihe von extrahypophysären menschlichen Organen beeinflusst. Es ist wahrscheinlich, daß LHRH eine autokrine beziehungsweise parakrine Funktion, unter anderem in der Plazenta, im Ovar, im Myometrium sowie in lymphatischen Zellen hat (zur Übersicht: Emons et al. 1997, Emons et al. 1998). Zahlreiche Experimente zeigen, daß LHRH-Analoga direkte Effekte auf die Proliferation von Tumorzellen ausüben vermögen. Das Wachstum von Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien kann sowohl durch LHRH-Agonisten als auch durch Antagonisten sowohl zeit- als auch dosisabhängig inhibiert werden (Thompson et al. 1991, Emons et al. 1993b und 1993c, Yano et al. 1994a, Imai et al. 1994). Bereits bei einer Konzentration von 10^{-9} mol/L des LHRH-Agonisten Triptorelin konnte eine signifikante Reduktion der Zellzahlen in den Ovarial- (EFO-21, EFO-27) und Endometriumkarzinomzelllinien (Ishikawa, HEC-1A) von Emons et al. (1993b, 1993c) beobachtet werden. Maximale Effekte wurden mit Triptorelin in der Konzentration 10^{-5} mol/L (30-40 % der Kontrollen) erzielt. Vergleichbare dosisabhängige antiproliferative Effekte wurden ebenso bei der Behandlung der Tumorzelllinien EFO-21, Ishikawa und HEC-1A mit dem LHRH-Antagonisten Cetrorelix gefunden, während diese Substanz (auch mit dem LHRH-Antagonisten Ramorelix) bei der Ovarialkarzinomzelllinie EFO-27 keinen Einfluß auf die Proliferation nahm. Die Annahme, daß die Proliferation von Ovarial- und Endometriumkarzinomen durch LHRH-Analoga direkt beeinflusst werden könnte, wird darüber hinaus durch die Tatsache gestützt, daß in Biopsien dieser beiden Tumoren zu einem hohen Prozentsatz (75-80 %) spezifische Bindungsstellen für LHRH und dessen Analoga gefunden werden konnten. Außerdem konnte die Expression der mRNA für den

hypophysären LHRH-Rezeptor in mehr als 80 % dieser Biopsien detektiert werden (Emons et al. 1989, Imai et al. 1994, Irmer et al. 1995, Srkalovic et al. 1998). Die Tatsache, daß antiproliferative Wirkungen *in vitro* bereits bei Konzentrationen des Analogons im nanomolaren Bereich signifikant werden, bekräftigt die Vermutung, daß diese Effekte über die hochaffinen Bindungsstellen vermittelt werden. Der zugrunde liegende Mechanismus ist jedoch auch heute noch nicht vollständig geklärt.

Mit der veröffentlichten Übereinstimmung des LHRH-Rezeptors in den Tumorzelllinien und Tumoren mit den hypophysären LHRH-Rezeptoren scheint es angebracht, zu spekulieren, daß der Signaltransduktionsweg in den Tumoren dem der hypophysären gonadotropen Zellen entspricht (Stojilkovic und Catt 1995). Allerdings konnten Emons et al. (1996c) anschaulich zeigen, daß der klassische hypophysäre LHRH-Rezeptor Signaltransduktionsweg nicht unmittelbar in die Weiterleitung der antiproliferativen Effekte von LHRH-Analoga involviert ist. Vielmehr interagieren LHRH-Analoga mit dem mitogenen Signaltransduktionsweg der Wachstumsfaktorrezeptoren und entsprechenden Onkogenprodukten, die mit einer Tyrosin-Kinase-Aktivität assoziiert sind (zur Übersicht siehe Emons et al. 1997). Es zeigte sich, daß die EGF-induzierte Aktivierung der MAP-Kinase (Mitogen activated protein Kinase), ein Enzym, daß sich weit unten in der Wachstumsfaktorsignalkaskade befindet (zur Übersicht: Hunter 1995) eindeutig mit Hilfe des LHRH-Agonisten Triptorelin in Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien blockiert wird (Emons et al. 1996c). Außerdem fand man, daß die EGF-induzierte Expression des immediate early gene *c-fos* zu einem noch späteren Zeitpunkt in der mitogenen Signaltransduktionskaskade mittels LHRH-Agonisten blockiert werden kann (Moretti et al. 1996, Gründker et al. 1998, Gründker et al. 1999). Diese Ergebnisse befinden sich im Einklang mit den Daten, daß LHRH-Analoga die Expression der Wachstumsfaktorrezeptoren (EGF, IGF-1) selbst und ihrer mRNA reduzieren (Yano et al. 1994b, Shirahige et al. 1994, Moretti et al. 1996). Ferner wird die wachstumsfaktorinduzierte Tyrosinkinase-Aktivität heruntergesetzt (Imai et al. 1996a, Imai et al. 1996b, Furui et al. 1995, Emons et al. 1996c, Moretti et al. 1996). Wahrscheinlich wird die wachstumsfaktorinduzierte Tyrosinphosphorylierung durch eine von den LHRH-Analoga aktivierten Phosphotyrosinphosphatase konteragiert (Lee et al. 1991, Imai et al. 1996a, Furui et al. 1995, Emons et al. 1996c, Moretti et al. 1996), die an den LHRH-Rezeptor über ein Gi-Protein gekoppelt ist (Imai et al. 1996b).

Neben den ermutigenden experimentellen Daten liegen leider bis heute bezüglich des Ovarialkarzinoms nur vereinzelte klinische Informationen über die direkte Wirkung von LHRH-Analoga vor (Foekens und Klijn 1992, zur Übersicht Emons und Schally 1994).

Bezüglich des Endometriumkarzinoms im Zusammenhang mit LHRH-Analoga existieren noch weniger klinische Studien und Veröffentlichungen (Gallagher et al. 1991).

1.5. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit und Versuchsplanung

Die vorgestellten Daten und Befunde lassen vermuten, daß in menschlichen Ovarial-, Endometrium- und Mammakarzinomen ein autokrines Regulationssystem existiert, das auf der Expression von LHRH und seinem Rezeptor basiert. Dieses System ist zumindest in vitro ein Target für LHRH-Agonisten und Antagonisten, über das die Proliferation dieser Tumoren effektiv gehemmt werden kann. Den Schwerpunkt der Arbeit bildeten Untersuchungen an humanen Zellkulturen, die als experimentelle Modellsysteme für Ovarial- und Endometriumkarzinome dienten. Die Befunde und Ergebnisse sollten zusätzlich durch entsprechende Untersuchungen an Primärtumoren des Ovars und des Endometriums ergänzt werden.

In den nachfolgend aufgeführten Untersuchungen sollte erarbeitet werden, ob LHRH-Analoga in Tumoren, ähnlich wie sie es in der Hypophyse tun, eine Down-Regulation der LHRH-Rezeptoren induzieren, und ob dieser Mechanismus die antiproliferativen Wirkungen der eingesetzten LHRH-Analoga erklärt. Zu diesem Zweck sollten Tumorzellen, die LHRH-Rezeptoren exprimieren, über verschiedene Zeiträume mit LHRH-Agonisten und LHRH-Antagonisten inkubiert werden. Anschließend sollte die Expression der mRNA für den LHRH-Rezeptor mit Hilfe einer zu etablierenden quantitativen RT-PCR analysiert werden. Gleichzeitig sollte unter den genannten Bedingungen mittels eines etablierten Radiorezeptorassays der Effekte auf die LHRH-Rezeptordichte demonstriert werden.

Im weiteren Teil dieser Arbeit wurde eine systematische Untersuchung über das Vorhandensein der mRNA für den LHRH-Rezeptor und die Expression der LHRH-Rezeptoren mit den oben genannten qualitativen Untersuchungsmethoden (qualitative RT-PCR, Spaltung mit Restriktionsendonukleasen, Southern-Blot und Radiorezeptorassay) in den im Labor vorhandenen Zelllinien wie auch an Primärtumoren durchgeführt. Die Befunde aus diesen Untersuchungen sollten die These des autokrinen Regulationssystem basierend auf LHRH und seinen Rezeptor für humane Ovarial- und Endometriumkarzinome untermauern.

Darüber hinaus sollte in der vorliegenden Arbeit geklärt werden, ob LHRH-Analoga die Wachstumsfaktorsignaltransduktion beeinflussen. Vorliegende Daten lassen vermuten, daß LHRH-Agonisten die Signaltransduktion von Wachstumsfaktorrezeptoren durch die Aktivierung einer Tyrosinphosphatase hemmen. Auch konnte gezeigt werden, daß dieser

Effekt sich entlang der Signaltransduktionskaskade bis zum Level der Mitogen activated protein-Kinase (MAP-Kinase) und der *c-fos* Expression fortsetzt. Die in verschiedenen Vorarbeiten untersuchte Beeinflussung der wachstumsfaktorinduzierten Tyrosinkinase-aktivität sollte nun dahingehend durch die Prüfung der Frage erweitert werden, ob durch LHRH-Analoga die Phosphorylierung der Wachstumsfaktorrezeptoren und/oder weiterer Proteine vermindert wird. Dafür sollte mittels eines semiquantitativen Western-Blots die Inhibition der wachstumsfaktorinduzierten Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors nach Inkubation der Tumorzellen mit LHRH-Analoga analysiert werden.

Mit den Erkenntnissen und der Demonstration des autokrinen, auf LHRH basierenden Regulationssystems in Ovarial- und Endometriumkarzinomen könnte schließlich ein Beitrag für die Entwicklung neuer therapeutischer Konzepte zur Behandlung dieser Malignome geleistet werden.

2. Material und Methoden

2.1. Abkürzungen

A	Absorption
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Cetrorelix	[Ac-D-Nal(2) ¹ , D-Phe(4Cl) ² , D-Pal(3) ³ , D-Cit ⁶ , D-Ala ¹⁰]LHRH (syn. SB-75)
Ci	Curie
Cpm	Counts pro Minute
DEPC	Diethylpyrocarbonat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
f	Femto (10^{-15})
g	Erdbeschleunigung ($9,81 \text{ m/s}^2$)
GnRH	Gonadotropin Releasing-Hormon (syn. LHRH)
HRP	Meerrettichperoxidase
Kb	Kilobasenpaare
Kd	Dissoziationskonstante
LHRH	Luteinisierendes Hormon-Releasing Hormon (syn. GnRH)
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
OD	Optische Dichte
p	Piko (10^{-12})
RIA	Radioimmunoassay
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
SD	Standardabweichung
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SE	Standardfehler
Taq	Thermus aquaticus
Triptorelin	[D-Trp ⁶]LHRH (Handelsname Decapeptyl [®])
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Internationale Einheit (Unit)

2.2. Zellkultur

2.2.1. Zelllinien

Für die Untersuchungen zur LHRH-Analogen vermittelten Signaltransduktion wurden im Wesentlichen je zwei intensiv charakterisierte und adhärent wachsende Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien verwendet. Die beiden Ovarialkarzinomzelllinien stammen dabei aus der Anzucht der Eppendorfer Universitätsfrauenklinik Hamburg (Prof. Dr. Hölzel, Simon et al. 1983). Bei der Zelllinie EFO-21 handelt es sich um Zellen, die aus Aszitesflüssigkeit einer 56-jährigen Patientin mit einem serösen, entdifferenzierten Adenokarzinom des Ovars gewonnen wurden. Die Zelllinie EFO-27 wurde aus einem serös papillärem, mäßig differenzierten Adenokarzinom des Ovars (Omentum majus-Metastase) einer 36-jährigen Frau angezüchtet. Die Endometriumkarzinomzelllinie Ishikawa (Nishida et al. 1985) wurde aus einem Adenokarzinom des Endometriums einer 39-jährigen Frau gewonnen und uns freundlicherweise von Prof. Dr. E Gorpide (Mount Sinai School of Medicine, New York) zur Verfügung gestellt. Die Zelllinie HEC-1A (Kuramoto et al. 1972a) stammte aus einem papillärem, schwach differenzierten Adenokarzinom einer 71-jährigen Patientin und wurde unserem Labor von Prof. Dr. T. Bauknecht (Universitätsfrauenklinik Freiburg) überlassen.

Einen tabellarischen Überblick über die Histologie und die Herkunft sämtlicher in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien gibt die Tabelle Tab. II-1.

2.2.2. Kultivierung der Zellen

Die Langzeitkultivierung der Zelllinien wurde im Begasungs-Brutschrank (Fa. Heraeus, Hanau) bei 37°C in einer wassergesättigten Luftatmosphäre mit 5 % Kohlendioxid (CO₂) durchgeführt. Als Kulturgefäße wurden Kunststoffzellkulturflaschen (80 cm², F. Nunc, Wiesbaden) verwendet. Das sterile Arbeiten mit den Zellkulturen erfolgte an Steril-Werkbänken mit vertikaler Luftströmung (Modelle DFOP 18 IIS und DFOP 12S Fa. Cryo-Technik, Hamburg).

Tab. II-1: Herkunft und Histologie der in der Arbeit verwendeten Zelllinien.

<u>Name</u>	<u>Herkunft</u>	<u>Histologie</u>	<u>Etablierung</u> <u>(Herkunft)</u>
<u>Ovarialkarzinomzelllinien</u>			
EFO-21	Aszites	Seröses Adenokarzinom, wenig differenziert	Simon et al. (1983) (F. Hölzel, Hamburg)
EFO-27	Netzmetastase	Seröses Adenokarzinom, papill., mäßig differenziert	Simon et al. (1983) (F. Hölzel, Hamburg)
NIH: OVCAR-3	Aszites	Adenokarzinom, schwach differenziert	Hamilton et al. (1983) (ATCC*)
BG-1	Primärtumor	Adenokarzinom, schwach differenziert	Geisinger et al. (1988) (ATCC*)
SK-OV-3	Aszites	Adenokarzinom	Fogh et al. (1977) (ATCC*)
SW 626	Zystadenom	Adenokarzinom schwach differenziert	Fogh et al. (1977) (ATCC*)
<u>Endometriumkarzinomzelllinien</u>			
Ishikawa	Primärtumor	Adenokarzinom, gut differenziert	Nishida et al. (1985) (E. Gurpide, New York)
HEC-1A	Primärtumor	Papilläres Adenokarzinom, schwach differenziert	Kuramoto et al. (1972a) (T. Bauknecht, Freiburg)
HEC-1B	Subkultur von HEC-1A	Adenokarzinom schwach differenziert	Kuramoto et al. (1972b) (ATCC*)
KLE	Primärtumor	Adenokarzinom schwach differenziert	Richardson et al. (1984) (ATCC*)
AN 3 CA	Metastase	Adenokarzinom schwach differenziert	Dawe et al. (1964) (ATCC*)
MFE 296	Primärtumor	Adenokarzinom, schwach differenziert	Hackenberg et al. (1994) R. Hackenberg, Marburg
<u>Sonstige</u>			
MCF-7	Pleuraerguß	Adenokarzinom, Mamma	Soule et al. (1973) Dachsenbichler, Innsbruck)
NRK Klon 49F	Niere	Normale Rattennierenfibro- plasten	Duc-Nguyen et al. (1966) (F. Hölzel, Hamburg)
αT3-1	Hypophyse	Hypophysentumor aus transgener Maus	Mellon PL (1990) (San Diego, California)

ATCC*: American Type Culture Collection; Zellen käuflich erworben

2.2.2.1. Kulturmedien

Als Grundlage für die Kultivierung der verwendeten Zelllinien diente Minimal Essential Medium (MEM, Eagle 1959), das mit Earle's Salzen ergänzt wurde.

Die Pulverform des Mediums (Instamed MEM-Earle, Fa. Biochrom, Berlin) wurde in Aqua Bidest gelöst und anschließend steril filtriert (Cellulose Nitrat Filter, Fa. Sartorius, Göttingen und Tiefenfilter, Fa. Seitz-Filter-Werke, Bad Kreuznach). Das Medium enthielt die zweifache MEM-Konzentration an Vitaminen, essentiellen und nicht essentiellen Aminosäuren. Ferner wurden dem Medium folgende Substanzen zugesetzt:

2,5	mg/L	Transferrin (Fa. Sigma, München)
67,0	mg/L	Gentamycinsulfat (Fa. Biochrom, Berlin)
2,2	g/L	NaHCO ₃ (Natriumhydrogencarbonat, Fa. Biochrom, Berlin)
40	IU/L	Insulin (Fa. Hoechst-Behring, Frankfurt)

und 10 % fötales Kälberserum (FCS, Fa. Boehringer, Mannheim). Dieses Wachstumsmedium wurde vor der sterilen Filtration auf einen pH-Wert von 7,4 - 7,6 eingestellt.

Für einige Versuche wurde ein serum- und phenolrotfreies Medium (Instamed MEM-Earle, Fa. Biochrom, Berlin) mit ansonsten gleichen Zusätzen wie oben verwendet. Anstelle von fötalem Kälberserum enthielt dieses 0,1 % Rinderserumalbumin (BSA, Fa. Sigma, München). Bei der Kultivierung der Zelllinie α T3-1 wurde Dulbecco's Modified Eagle's-Pulvermedium (DMEM, Fa. Sigma, München) verwendet, das mit folgenden Zusätzen versetzt wurde:

3,8	g/L	NaHCO ₃ (Natriumhydrogencarbonat, Fa. Biochrom, Berlin)
67,0	mg/L	Gentamycinsulfat (Fa. Biochrom, Berlin)
10 %		fötales Kälberserum (FCS, Fa. Boehringer, Mannheim)

2.2.2.2. Passagieren adhärenter Zellen

Die Zellen wurden in bestimmten Zeitintervallen, die sich individuell nach den Wachstumseigenschaften der jeweiligen Zelllinien richteten, passagiert. Bei Erreichen einer adhärenenten Konfluenz der Zellmonolayer von 80 – 90 % wurden sie mit einer Trypsin/EDTA-Lösung im Brutschrank 5 – 10 min inkubiert, wobei der Vorgang der Ablösung der Zellen

regelmäßig im Phasenkontrastmikroskop (ID 03, Fa. Zeiss, Jena) kontrolliert wurde. Die Trypsin/EDTA-Lösung setzte sich wie folgt zusammen:

140	mmol/L	NaCl (Natriumchlorid, Fa. Merck, Darmstadt)
3	mmol/L	KCl (Kaliumchlorid, Fa. Merck, Darmstadt)
8	mmol/L	Na ₂ HPO ₄ (Dinatriumhydrogenphosphat, Fa. Merck, Darmstadt)
1,5	mmol/L	KH ₂ PO ₄ (Kaliumdihydrogenphosphat, Fa. Merck, Darmstadt)
2,5	mmol/L	EDTA (Fa. Merck, Darmstadt)
2000	U/L	Trypsin (Fa. Serva, Heidelberg)

Die so abgelösten Zellen wurden nach dem Ablösen auf neue Kulturflaschen verteilt oder nach Bestimmung der Zellzahl in einer Neubauer- beziehungsweise Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (Fa. Zeiss, Oberkochen) je nach Versuchsprotokoll auf die entsprechenden Versuchs-Zellkulturgefäße ausgesät. Überschüssige Zellen konnten für die Langzeitkonservierung tiefgefroren werden (s. 2.2.2.3.). Ein Teil der Zellen wurde verworfen.

2.2.2.3. Kryokonservierung

Für eine Langzeitkonservierung wurden die Zellen wahlweise in einer Kühleinheit bei -80°C (Tiefgefriertruhe, Fa. Heraeus, Hanau) oder in flüssigen Stickstoff bei -172°C (Chronos-Flüssigstickstoffbehälter, Fa. Messer Griesheim, Siegen) tiefgefroren. Hierzu wurden die Zellen zunächst abtrypsiniert, die Trypsin/EDTA-Zell-Suspension mit dem gleichen Volumenanteil Wachstumsmedium versetzt und in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation (10 min, $30 \times g$) wurde der Überstand verworfen, das Zellsediment in 1,5 ml Wachstumsmedium mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO, Fa. Serva, Heidelberg) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen (Fa. Nunc, Wiesbaden) überführt, bevor dieses umgehend tiefgefroren wurde. Bei Bedarf wurden die Zellen aufgetaut, in eine Zellkulturflasche mit Wachstumsmedium (25 ml) überführt und im Brutschrank neu angezüchtet.

2.2.3. Proliferationsassays

Die antiproliferative Wirkung von LHRH-Analoga auf das Wachstum der Karzinomzelllinien wurde in verschiedenen Versuchen sowohl zeit- als auch dosisabhängig untersucht.

Hierzu wurden subkonfluente Zellmonolayer abtrypsiniert (2.2.2.2.) und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurde eine definierte Zellzahl (10.000 Zellen/ml Wachstumsmedium) in 4-Well Kulturschalen (Fa. Nunc, Roskilde, DK) ausgesät und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Im Anschluß an diese Anwachsphase (Tag 0) wurde das Medium abgesaugt und die adhärennten Zellen einmal mit Medium gewaschen. Daraufhin wurde pro Well 1 ml Versuchsmedium mit der zu testenden Substanz bzw. mit dem entsprechenden Volumen Phosphate buffered saline (PBS) zugegeben. Dieser PBS-Puffer diente auch zur Herstellung entsprechender Verdünnungsreihen und setzte sich folgendermaßen zusammen:

140	mmol/L	NaCl (Natriumchlorid, Fa. Merck, Darmstadt)
3	mmol/L	KCl (Kaliumchlorid, Fa. Merck, Darmstadt)
8	mmol/L	Na ₂ HPO ₄ (Dinatriumhydrogenphosphat, Fa. Merck, Darmstadt)
1,5	mmol/L	KH ₂ PO ₄ (Kaliumdihydrogenphosphat, Fa. Merck, Darmstadt)
0,1 %		Rinderserumalbumin (BSA)

Ebenfalls an Tag 0 wurden bereits die Zellen einer 4-Well Kulturschale trypsiniert, um die Ausgangszellzahl zu bestimmen, die der Anzahl an Zellen entsprach, die während der Anwachsphase am Boden der Schalen adhärent festgewachsen waren.

Die weitere Behandlung der Zellen variierte je nach Intention des entsprechenden Proliferationsassays:

- a) Zur Untersuchung der zeitabhängigen Wirkungen von Triptorelin auf die Proliferation von Tumorzellen wurden die Zellen mit 10^{-5} mol/L Triptorelin für 1-5 Tage im Brutschrank inkubiert. An den Tagen 1 bis 5 wurde jeweils die Zellzahl in einer behandelten 4-Well und einer Kontrollschale (mit PBS versetzt) bestimmt.
- b) Zur Untersuchung der dosisabhängigen Wirkung von Triptorelin auf die Proliferation von Tumorzellen wurden die Zellen mit Triptorelin in den Konzentrationen 10^{-11} mol/L, 10^{-9} mol/L, 10^{-7} mol/L und 10^{-5} mol/L behandelt und für 5 Tage im Brutschrank inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Zellzahlen in den behandelten 4-Well Schalen und der mit PBS versetzten Kontrollschale ermittelt.

2.3. Biochemische Methoden

2.3.1. Alkalische Lyse

Für die Bestimmung der LHRH-Aktivität in Extrakten aus dem Gewebe resezierter Tumoren wurden die Gewebeprobe durch die alkalische Lyse nach der Methode von Emanuele et al. (1990) aufgearbeitet. Für die Untersuchung der soliden Tumoren wurde das Gewebe direkt nach der Resektion in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Das Gewebe wurde im gefrorenen Zustand mit einem Skalpell kleingeschnitten, direkt in 2ml NaOH (0,1 mol/L) mit einem Glas-Glas-Handpotter homogenisiert und 20 min bei RT inkubiert. Die Lösungen wurden mit HCL (1 mol/L) auf pH 7,4 eingestellt und anschließend mit dem gleichen Volumenverhältnis PBS-Puffer, dem vorher 0,25 % BSA zugesetzt wurden, versetzt und sorgfältig vermischt. Zelltrümmer und denaturierte Proteine wurden dann durch Zentrifugation ($400 \times g$, 10 min) abgetrennt. Der Überstand wurde letztlich portioniert und bis zum Ansatz des Radioimmunoassays bei -20°C gelagert.

2.3.2. Quantifizierung von Proteinen

Die Quantifizierung von Proteinen in einer Probe wurde photometrisch analysiert. Dabei wurde nach der Methode von Bradford mit dem Biorad Protein Assay Kit (Fa. Biorad, München) eine Umsetzung der Proteine mit einem Farbstoff (Coomassie Brilliant Blue G-250 in Phosphorsäure) durchgeführt. Die Methode basiert auf der Beobachtung, daß das Absorptionsmaximum einer sauren Lösung von Coomassie Brilliant Blue durch spezielle Proteinbindung von 465 nm auf 595 nm Wellenlänge verschoben wird (Bradford 1976).

Für die Proteinbestimmung wurden jeweils 50 μl einer Probe, beziehungsweise einer Verdünnung eines BSA-Proteinstandards mit 5 ml des fertig bezogenen Biorad-Reagenzes (vorher 1:5 in Aqua Bidest verdünnt) versetzt, kurz kräftig geschüttelt und anschließend mindestens 5 min bei RT inkubiert. Die BSA-Proteinstandards wurden aus einer Stammlösung in die folgenden Konzentration verdünnt: 20, 40, 60, 80, 100, 120 und 140 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$. Nach der Inkubationszeit wurden die Proteinstandards sowie die Proben im Spektralphotometer (DU-64, Fa. Beckman) bei 595 nm gegen einen Leerwert gemessen. Im nachhinein wurden anhand einer mit den BSA-Proteinstandards erstellten Kalibrationskurve die Proteinkonzentrationen der Proben quantifiziert.

2.3.3. LHRH-Radiorezeptorassay

Alle in Tabelle Tab. II-1 beschriebenen Zelllinien wurden genau wie die rezidierten soliden Tumoren (vgl. 2.5. Patientinnenkollektiv) auf die Existenz von spezifischen LHRH-Bindungsstellen untersucht. Die Analyse erfolgte in einem speziellen Radiorezeptorassay mit ^{125}I -radioaktiv markiertem Triptorelin (vgl. 2.3.3.4.) als Liganden nach Emons et al. (1993b, 1993c). Dieser Bindungsassay zum Nachweis der hochaffinen Bindungsstellen mit niedriger Kapazität und der niedrigaffinen Bindungsstellen mit hoher Kapazität beruht auf einer Verdrängungsreaktion des Liganden von markiertem und unmarkiertem Triptorelin in ansteigenden Konzentrationen (10 pmol/L bis 100 $\mu\text{mol/L}$) an den spezifischen Bindungsstellen. Der Assay unterteilte sich in drei Abschnitte: der Zellmembran-Isolation, den eigentlichen Ansatz und der Detektion im γ -Counter (Gammachem 9612, Fa. Serono Diagnostics Freiburg) mit der nachfolgenden computerunterstützten Auswertung und der Bestimmung der Bindungsstellen pro Zellzahlen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem LIGAND Computerprogramm (Clayton et al. 1979) mit einer 2-Bindungsstellen-Analyse.

2.3.3.1. Präparation der Zellmembranen

Für die Zellmembranpräparation waren folgende Lösungen notwendig:

<u>Assaypuffer:</u>	TRIS	0,012 mol/L
	NaN_3	0,10 %
	BSA	0,10 %
	pH-Wert auf 7,6 einstellen	
	am Tag des Assays werden in 100 ml des Assaypuffers 0,0154 g Dithiothreitol (DTT) gelöst	
<u>PBS/EDTA-Puffer:</u>	NaCl	140 mmol/L
	KCl	3 mmol/L
	Na_2HPO_4	8 mmol/L
	KH_2PO_4	1,5 mmol/L
	EDTA	0,02 %
	BSA	0.1 %

2.3.3.1.1. Präparation der Zellmembranen aus Zellkulturen

Die Aussaat der Zellen erfolgte aus einer Zellsuspension prinzipiell in 40 Petrischalen (Durchmesser 9,4 cm, Fa. Greiner) in je 15 ml MEM-Medium. Bei Erreichen einer 70-80 %igen Konfluenz wurden die Zellen wie folgt abgeerntet. Das Medium wurde abgegossen und die Zellen einmal mit 4 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde in jede Petrischale 2 ml PBS/EDTA-Puffer gegeben, die Zellen mit einem Zellschaber sorgfältig vom Boden abgeschabt und die Zellsuspension in zwei im Eisbad bei 4°C vorgekühlte 50 ml Falconröhrchen überführt. Aus jedem Röhrchen wurde ein Aliquot entnommen und die Zellzahl unter dem Mikroskop bestimmt. Danach wurde die Zellsuspension 15 min bei 200 x g und 4°C zentrifugiert, das Pellet einmal mit 25 ml PBS gewaschen und die resuspendierten Zellen nochmals 15 min bei 200 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in auf 4°C vorgekühlten DTT-Assaypuffer resuspendiert, in einen Glas-Glas-Handpotter überführt und im Eisbad sorgfältig homogenisiert. Das Homogenat wurde in 12 ml Zentrifugenröhrchen (Fa. Greiner) überführt und mit 5 ml DTT-Assaypuffer aufgefüllt. Anschließend wurde das Homogenat erneut 15 min bei 200 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand in zwei neue Zentrifugenröhrchen überführt, während das Pellet verworfen wurde. Dieser Überstand wurde abermals 15 min bei 200 x g und 4°C zentrifugiert. Letztlich wurde der Überstand in der Ultrazentrifuge bei 4°C mit 70.000 x g für 50 min zentrifugiert, bevor das Pellet mit den Plasmamembran-Bestandteilen wiederum in DTT-Assaypuffer aufgenommen und mit Hilfe eines Glas-Glas-Handpotters im Eisbad bei 4 °C resuspendiert und homogenisiert wurde.

2.3.3.1.2. Präparation der Zellmembranen aus Tumoren

Aus den Tumorproben, die für die Untersuchung direkt nach der Resektion in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert wurden, wurde im gefrorenen Zustand jeweils ein etwa 1 g schweres Stück mit einem Skalpell herausgeschnitten und unter Zugabe von 2 ml DTT-Assaypuffer möglichst kleingeschnitten. Danach wurde diese breiige Masse mit 2 ml DTT-Assaypuffer versetzt, in einen Glas-Glas-Handpotter überführt und im Eiswasser sorgfältig homogenisiert. Anschließend wurde diese homogene Suspension mit 6 ml DTT-Assaypuffer vermischt und bei 200 x g und 4°C 15 min zentrifugiert. Mit dem Überstand wurde wie bei der Präparation aus Zelllinien (2.3.3.1.1.) verfahren. Nach der Zentrifugation in der Ultrazentrifuge und der nachfolgenden Homogenisierung wurde die

Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt. So präpariert wurden in jedem Ansatz 100 µl der Membranhomogenat-Lösung im Rezeptorassay eingesetzt.

2.3.3.2. Ansatz des Rezeptorassays

Für jede einzelne Standardverdünnung von nicht radioaktiv markiertem Triptorelin sowie für Total Counts (TC) und die Totale Bindung (TB) wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Werte für die nicht spezifische Bindung und die Konzentration 10^{-4} mol/L wurden in einer Doppelbestimmung ermittelt. Der gesamte Ansatz wurde im Eiswasser bei 0°C und in 4 ml Polypropylen-Tubes (Fa. Greiner) durchgeführt.

Dazu wurde zunächst eine Standardreihe mit nicht radioaktiv markierten Triptorelin so angesetzt, daß in jedem Tube letztlich nach Zugabe von Tracer und Membranhomogenat beziehungsweise DTT-Assaypuffer eine Konzentration von 10^{-4} bis 10^{-13} mol/L in einer Serienverdünnung (1:10) mit den Zwischenkonzentrationen $3 \cdot 10^{-10}$, $3 \cdot 10^{-9}$, $3 \cdot 10^{-7}$ und $3 \cdot 10^{-6}$ mol/L vorgelegt wurde. Anschließend wurde in alle Tubes radioaktiv markiertes Triptorelin (Tracer mit etwa 100.000 Cpm/100 µl) pipettiert, bevor in die entsprechenden Verdrängungskurvenkonzentrationen und die TB das Membranhomogenat (jeweils 100 µl) zugegeben wurde. In die NSB und TB wurden zusätzlich die entsprechenden Mengen DTT-Assaypuffer pipettiert.

Tab. II-2: Reaktionsansatz und Pipettierschema des LHRH-Radiorezeptorassays. (TC, Total Counts; NSB, nicht spezifische Bindung; TB, totale Bindung)

	Tube-Nr.	Standard	DTT-Assaypuffer	Tracer	Membranhomogenat
TC	1-3	-	-	100 µl	-
TB	4-6	-	100 µl	100 µl	100 µl
NSB	6-8	-	200 µl	100 µl	-
Verdrängungskurve	9-49	je 100 µl	-	100 µl	100 µl

Der Ansatz wurde anschließend bei 4°C im Eiswasser für 90 min auf einem Schüttler inkubiert.

2.3.3.3. Detektion und Auswertung

Nach der Inkubation wurden die Proben mit Hilfe des Harvesters (Combi Cell Harvester, Fa. Skatron) über eine Filtermembran (FilterMat 11734, 1µm Retention, Fa. Skatron) mit 3 ml 2 % BSA in PBS und 6 ml 0,2 % BSA in PBS so abgesaugt, daß die Plasmamembranprotein-Rezeptor-Liganden Komplexe auf der Filtermembran gebunden und das freie nicht gebundene radioaktiv markierte Steroid ausgewaschen wurden. Anschließend wurden die Filter in Szintillations-Tubes (Scintillation Vials 15763, Fa. Skatron) ausgestanzt und die Tubes im γ -Counter (Gammachem 9612, Fa. Sero Diagnostics Freiburg) gemessen. Aus den Dreifach- beziehungsweise Doppelbestimmungen wurde jeweils der Mittelwert berechnet und diese Werte in das LIGAND-Programm eingegeben, welches mit der Angabe der spezifischen Aktivität des Tracers die Dissoziationskonstanten K_{d1} und K_{d2} , sowie die spezifischen Bindungen B_{max1} und B_{max2} berechnete. Die Auswertung der Daten erfolgte hier mit einer 2-Bindungsstellen-Analyse nach der Methode von Scatchard. Für jeden Meßpunkt wurde der Quotient spezifisch gebundenes / freies Steroid auf der y-Achse gegen die spezifische Bindung (gebundenes – NSB in fmol/L) auf der x-Achse aufgetragen. Die durch die Punkte zu legenden Geraden ermöglichten die folgenden Aussagen. Die Schnittpunkte mit der x-Achse gaben die Anzahl der Bindungsstellen (Rezeptorkonzentration B_{max1} und B_{max2}) wieder. Diese Werte wurden anschließend entweder auf die vor der Membranpräparation ermittelten Zellzahlen (ergab die spezifischen LHRH-Bindungsstellen pro 10^6 Zellen) oder auf die Proteinkonzentration bezogen. Aus den Steigungen der Geraden (reziproke Werte) wurden die Dissoziationskonstanten K_{d1} und K_{d2} berechnet, die eine Aussage über die Affinität der Rezeptorbindung ermöglichten.

2.3.3.4. Radioaktive Markierung von Triptorelin

In den Radiorezeptorassays zum Nachweis der spezifischen LHRH-Bindungsstellen wurde der LHRH-Agonist Triptorelin mit ^{125}I radioaktiv markiert. Die Markierung nach der Iodogen-Methode und die darauffolgende Reinigung über eine HPLC-Anlage lieferte den fertigen Tracer für die einzelnen Radiorezeptorassays.

Für die Markierung wurde das Triptorelin immer frisch abgewogen und in 0,1 mol/L PBS (pH 7,4) zu einer Konzentration von 10 µg / 20 µl verdünnt. Vorher wurde das kommerziell erworbene IODO-GEN[®] (Iodination Reagent, Fa. Pierce) in Dichlormethan (CH_2Cl_2) mit

einer Konzentration von 2 mg/ml gelöst. Nachfolgend wurden jeweils 20 µl dieser Lösung in ein Eppendorfgefäß (1,5 ml) pipettiert und unter sorgfältigem Drehen ein gleichmäßiger Oberflächenfilm durch Verdampfen des Lösungsmittels erzeugt. Die so präparierten Iodogen-Reaktionsgefäße konnten lichtgeschützt (in Aluminiumfolie) bei Raumtemperatur gelagert werden. Für die eigentliche Markierung wurde das in PBS gelöste Triptorelin (20 µl mit $c = 10 \mu\text{g} / 20 \mu\text{l}$) und die Radioaktivität (Iodine-125, 2 mCi, Fa. Amersham) in das Iodogen-Reaktionsgefäß pipettiert und unter vorsichtigem Antippen des Gefäßes für 10 min inkubiert. Anschließend wurde das markierte Triptorelin mit Hilfe einer HPLC-Anlage mit Fraktionssammler von vorhandenen Verunreinigungen gereinigt. Für die Reinigung und Trennung wurde eine C₈-Fertigsäule (LiChrospher 100 RP-8 endcapped, Fa. Merck) und die Laufmittel Trifluoressigsäure (TFA 0,1 %) und Trifluoressigsäure / 70 % Acetonitril (TFA 0,1 % / 70 % ACN) verwendet. Mit einem Gradienten-Programm auf 45 % TFA 0,1 % wurden unter Verwendung des Fraktionssammlers einzelne Fraktionen aufgefangen. Die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wurde im γ -Counter (Gammachem 9612, Fa. Serono Diagnostics Freiburg) gemessen und die Fraktion mit der höchsten Aktivität als Tracer selektiert. Diese Fraktion wurde umgehend mit frisch angesetztem TRIS-HCl-Puffer (Assaypuffer ohne DTT) auf eine Aktivität von 150.000 – 200.000 Cpm/100 µl verdünnt und in 4 ml Portionen bei –20°C gelagert (Haltbarkeit 6-8 Wochen).

Die Bestimmung der spezifischen Aktivität und der maximalen Bindungsfähigkeit des Tracers erfolgte im Anschluß mit aus α T3-1 präparierten Zellmembranproteinen (2.3.3.1.1.) nach Emons et al. (1994).

2.3.4. Messung der LHRH-Rezeptor-Regulation mit dem LHRH-Radiorezeptorassay

Der oben beschriebene LHRH-Radiorezeptor-Bindungsassay (2.3.3.) wurde im folgenden Versuchsansatz dazu verwendet, um die Regulation der LHRH-Rezeptor-Expression unter dem Einfluß der LHRH-Analoga Triptorelin (LHRH-Agonist) und Cetrorelix (LHRH-Antagonist) in den Ovarialkarzinomzelllinien EFO-21 und EFO-27 sowie den Endometriumkarzinomzelllinien Ishikawa und HEC-1A zu bestimmen und zu quantifizieren. Die einzelnen Zelllinien wurden in einem doppelten Ansatz mit je zwei verschiedenen Passagen entsprechend dem Protokoll 2.3.3. in MEM-Medium in Petrischalen ausgesät: die Kontrolle wurde 96 h mit PBS und die Versuchsschalen 96 h mit jeweils 10^{-5} mol/L des

Analogons inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abgeschabt, die Zellzahl bestimmt und die Zellsuspension entsprechend Szöke et al. (1994) behandelt. Diese auf die Versuchs- und Kontrollfraktionen angewandten drei Puffer-Waschschritte mit den jeweiligen Zentrifugationsschritten gewährleisteten, daß das entsprechende Analogon aus der 96 stündigen Inkubation vollständig von den Rezeptor-Bindungsstellen gewaschen wurde. Darauffolgend wurden die jeweiligen Plasmamembranen nach 2.3.3.1.1. aufgearbeitet, der Rezeptorassay nach 2.3.3.3. angesetzt und nach 2.3.3.4. ausgewertet. Letztlich wurden die erhaltenen Dissoziationskonstanten und spezifischen Bindungen der Versuchsproben mit den dazugehörigen Kontrollproben verglichen.

2.3.5. Radioimmunoassay

Zum Nachweis von Substanzen mit LHRH-Immunreaktivität in Zellextrakten oder Gewebeproben kam ein Doppel-Antikörper-Radioimmunoassay zur Anwendung (Nett und Adams 1977, Mason-Garcia et al. 1985). Das Prinzip dieses Radioimmunoassays (RIA) beruht auf einer Verdrängungsreaktion zwischen nicht radioaktiv markierter und radioaktiv markierter immunreaktiver Substanz bei der Bindung an den für LHRH spezifischen Antikörper K-29 (Fa. Ferring Arzneimittel, Kiel).

2.3.5.1. LHRH Radioimmunoassay

Die Quantifizierung der in den Proben vorhandenen LHRH-Immunoreaktivität erfolgte anhand einer mit authentischem humanen LHRH (Fa. Sigma, München) erstellten Eichkurve. Dabei wurde das authentische LHRH in der Ausgangsverdünnung von 5000 pg/ml in dem Puffer M I in 1:2 Serienverdünnung bis zu 19 pg/ml verdünnt. Die Verdünnungen wie der RIA selbst wurden in 4 ml Polypropylen-Reagenzröhrchen (Fa. Greiner, Nürtingen) durchgeführt und jeweils in einer Dreifachbestimmung angesetzt. Den genauen Reaktionsansatz zeigt die Tabelle II-3. Für den Versuch wurden folgende Lösungen benötigt:

<u>Puffer M I:</u>	NaCl	0,15 mol/L	
	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,05 mol/L	
	Merthiolat	0,01 %	
	BSA	0,1 %	pH-Wert auf 7,6 einstellen

<u>Puffer D:</u>	NaCl	0,15 mol/L	
	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,05 mol/L	
	EDTA	0,05 mol/L	
	Merthiolat	0,02 %	
	BSA	1,00 %	pH-Wert auf 7,2 einstellen
<u>Assaypuffer:</u>	NaCl	0,30 mol/L	
	NaH ₂ PO ₄	0,025 mol/L	
	Merthiolat	0,02 %	
	BSA	0,25 %	pH-Wert auf 7,4 einstellen

Für das Antiserum wurde der polyklonale Antikörper K-29 in Puffer D 1:1000 vorverdünnt und in 100 µl Portionen bei -20°C gelagert. Für den RIA selbst wurde der vorverdünnte Antikörper (100 µl) in 6 ml Puffer M I gemischt, dem außerdem noch 60 µl Kaninchenserum (Fa. Sigma München) zugesetzt wurden. Der Tracer – (3-[¹²⁵I]iodotyrosyl)LHRH mit der spezifischen Aktivität von 2000 Ci/mmol von Fa. Amersham (Braunschweig) – wurde portioniert in Puffer M I bei -20°C gelagert. Erst kurz vor dem RIA wurde die aufgetaute portionierte Probe am γ-Counter (Gammachem 9612, Fa. Sero Diagnostics Freiburg) gemessen und auf eine Konzentration von 25 pmol/L (Aktivität ca. 10.000 Cpm) in 100 µl Puffer M I eingestellt.

Der Reaktionsansatz wurde entsprechend Tabelle II-3 zusammenpipettiert und anschließend über Nacht bei RT unter vorsichtigem Schütteln inkubiert.

Tab. II-3: Reaktionsansatz und Pipettierschema des LHRH-RIA. (NSB, nicht spezifische Bindung; B₀ spezifische Bindung)

	Tube-Nr.	Standard	Probe	Puffer M I	Antiserum	Tracer
Total	1-3	-	-	-	-	100 µl
NSB	4-6	-	-	200 µl	-	100 µl
B ₀	7-9	-	-	100 µl	100 µl	100 µl
Eichkurve	10-39	je 100 µl	-	-	100 µl	100 µl
Probe	40-...	-	je 100 µl	-	100 µl	100 µl

Die folgende Trennung des an den Antikörper K-29 gebundenen und ungebundenen [D-Trp⁶]LHRH erfolgte aufgrund der Vernetzung der Antigen-Antikörper-Komplexe durch einen zweiten Antikörper unterstützt von Polyethylenglykol (PEG; Fa. Merck, Darmstadt) und anschließender Pelletierung durch Zentrifugation.

Außer in Total wurden zu jeder Probe 100 µl Human-Poolserum (Klinisches Labor der Universitäts-Frauenklinik Marburg), 100 µl des zweiten Antikörpers (Donkey-anti-rabbit-IgG-Antikörper; Fa. IBL, Hamburg), der 1:24 in Assaypuffer verdünnt wurde und 1 ml 7 % PEG in Assaypuffer gegeben und für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben 20 min bei 4°C und 2500 x g (Sorvall-Zentrifuge, Rotor HS-4) zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Absaugen entfernt, das Pellet erneut in 1 ml 7 % PEG in Assaypuffer aufgenommen und wieder für 20 min bei RT inkubiert um nochmals zentrifugiert zu werden. Letztlich wurde der Überstand abgesaugt und die im Pellet verbliebene an den Antikörper gebundene Radioaktivität im γ-Counter bestimmt.

Mit Hilfe dieses RIA konnten Konzentrationen von LHRH bis zu 2 pg / mg Protein spezifisch nachgewiesen werden.

2.4. Molekularbiologische Methoden

2.4.1. RNA-Isolierung

Die Isolierung und Handhabung der RNA bedurfte generell einer besonderen Sauberkeit, da Kontaminationen durch ubiquitär vorkommende unspezifische Ribonukleasen (RNasen) verhindert werden mußten. Verbrauchsmaterialien aller Art (Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße u. a.) wurden als sterile Einmalartikel verwendet und gesonderten Packungen entnommen. Glasgefäße wurden mindestens 2 h bei 200°C sterilisiert. Alle verwendeten Lösungen und Puffer wurden mit Diethylpyrocarbonat-behandeltem Wasser (DEPC-Wasser) angesetzt. Dazu wurde 0,1 % DEPC in Aqua Bidest gelöst, unter Rühren über Nacht inkubiert und anschließend das DEPC durch Autoklavieren inaktiviert. DEPC inaktiviert durch Carboxyethylierung des Imidazol-Stickstoffs von Histidinresten und freien Aminosäuren im Aqua Bidest jegliche Art von Ribonucleasen (Fedorcsak und Ehrenberg 1966). Zudem wurde ausschließlich mit Einmalhandschuhen gearbeitet.

2.4.1.1. Isolierung von Gesamt-RNA

Die präparative Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des kommerziellen RNeasy Mini Kits (Fa. QIAGEN), das alle Reagenzien außer Ethanol und DEPC-Wasser enthielt und wurden nach dem entsprechenden Protokoll durchgeführt.

Die Technologie kombiniert die selektiven Bindungseigenschaften einer Silikagel-Membran mit der Minizentrifugation. Ein spezielles Puffersystem erlaubt es dabei mehr als 100 µg RNA (länger als 200 Basen) an die Silikagel-Membran zu binden.

Die Proben wurden zunächst in Gegenwart von Guanidinoisothiocyanat-Puffer (GIT-Puffer) lysiert und homogenisiert. Das Guanidinoisothiocyanat inaktiviert RNasen und stellt sicher, daß intakte RNA isoliert wird. Bei der Aufarbeitung der Zellen in Kultur wurde zunächst das Medium abgeschüttet und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen abtrypsiniert (vgl. 2.2.2.2.) und die Wirkung des Trypsins mit PBS inhibiert, bevor sie für 10 min bei 400 x g zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 600-1000 µl mitgelieferten GIT-haltigen Lysepuffer aufgenommen. Das Zellysats wurde anschließend mehrfach mit einer 2 ml-Spritze (Fa. Braun, Melsungen) über eine 20G-Kanüle aufgezogen und wieder abgelassen, wodurch die chromosomale DNA durch die Scherkräfte zerstört wird und die Viskosität des Zellysats deutlich abnahm.

Gewebeproben wurden nach der chirurgischen Resektion augenblicklich in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C aufbewahrt. Für die Isolierung der RNA wurden die Proben möglichst noch in gefrorenem Zustand mit einem sterilen Skalpell in 0,5 x 0,5 cm (ca. 1 g) große Stücke zerteilt und in einen Glas-Glas-Potter überführt. Unter Zugabe von Lyse-Puffer (ca. 1,5 ml) wurde die Probe per Hand im Glas-Glas-Potter homogenisiert. Auch diese Proben wurden letztlich über eine 20G-Kanüle geschert.

Anschließend wurde Ethanol zugesetzt und die Probe in eine RNeasy Mini Spin Säule appliziert, wo die total-RNA an die Silikagel-Membran bindet und vorhandene Kontaminationen mit verschiedenen Waschpuffern effizient ausgewaschen wurden. Gebundene hochwertige RNA wurde nachfolgend mit 50 µl DEPC-Wasser eluiert.

2.4.1.2. Quantifizierung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren haben im ultravioletten Licht bei einer Wellenlänge von 260 nm ein Absorptionsmaximum, das durch die starke Absorption der aromatischen Heterozyklen, speziell der Purin- und Pyrimidinbasen hervorgerufen wird. Dieses charakteristische Absorptionsmaximum ermöglicht es, die Konzentration der eingesetzten Probe anhand des Lambert-Beer'schen Gesetzes direkt zu berechnen. Die Breite des Maximums ist ein Indikator für die Reinheit der DNA beziehungsweise RNA, wobei sich Protein-Verunreinigungen durch eine Schulter in der Absorptionskurve bei 280 nm bemerkbar machen.

Die Absorption der Proben wurde in einem Gesamtvolumen von 70 µl in speziellen 1 cm Quarzküvetten (Quarzglas Suprasil, Fa. Hellma) gegen das reine Lösungsmittel (DEPC-Wasser) im Spektralphotometer (GeneQuant II, Fa. Pharmacia Biotech) bestimmt.

2.4.2. RT-PCR

Bei der Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) wird mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase aus der Gesamt-RNA der zu untersuchenden Zellen oder Geweben die mRNA in den komplementären Strang umgeschrieben (first strand cDNA) und die Zielsequenz anschließend mit Hilfe von Oligonukleotid-Primern in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in vitro vermehrt (Mullis und Falona 1987). Bei der PCR wird anhand dieser Oligonukleotide, die die zu amplifizierende Region beider DNA-Stränge flankieren, in sich wiederholenden Zyklen von Denaturierung der Doppelstrang-DNA, Anlagerung der Primer und Polymerisation durch das hitzestabile Enzym Taq-Polymerase die Zielsequenz exponentiell vermehrt.

2.4.2.1. cDNA-Synthese

Mit der Hilfe von Oligo-(dT)₁₅ Primern (Fa. Boehringer), die spezifisch an die Poly(A)-Sequenz der mRNA binden werden unter Zugabe von Moloney Murine Leukemia Virus – Reverse Transkriptase (MMLV-RT; Fa. Gibco) aus der Gesamtheit der unterschiedlichen RNA Moleküle gezielt die ersten komplementären DNA-Stränge synthetisiert. Diese aus mRNA komplementär umgeschriebene first strand cDNA wird dann direkt als Matrize in der eigentlichen PCR eingesetzt.

Der Reaktionsansatz der cDNA-Synthese setzte sich aus folgenden Reagenzien zusammen:

Oligo-(dT) ₁₅ Primer	1,25 µg
dNTP's (Fa. Boehringer) je	1 mmol/L
Dithiothreitol	10 mmol/L
Rnasin (Fa. Promega)	80 Units
MMLV-RT	300 Units
TRIS-HCl pH 8,3	50 mmol/L
KCl	75 mmol/L
MgCl ₂	3 mmol/L

Die entsprechenden Reagenzien wurden in einem Prämix in 32,4 µl gemischt, wobei die Salze (TRIS-HCl, KCl und MgCl₂) in einem fertig mitgelieferten 5 x RT-Puffer in diesem Reaktionsansatz 1:5 verdünnt wurden.

Die auf eine Konzentration von 4 µg / 7,6 µl verdünnte RNA-Probe wurde zunächst im Thermocycler 10 min bei 70°C denaturiert und anschließend auf 4°C gekühlt. Dann wurden zu der Probe die 32,4 µl Prämix zugegeben, die Lösung gut gemischt und nachfolgend 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Enzym MMLV-RT für 10 min bei 95°C denaturiert und die so erhaltenen first strand cDNA-Proben bei -20°C gelagert.

2.4.2.2. Polymerase-Ketten-Reaktion

PCR (Polymerase chain reaction) ist die Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren: Spezifische DNA-Sequenzen können in vitro in einem einzigen Reaktionszyklus mit hoher Ausbeute amplifiziert werden. Das Reaktionsprinzip der PCR entspricht dabei der Replikation (Verdopplung) der DNA in der Zelle, wobei die hitzestabile Taq-DNA-Polymerase neue DNA anhand einer vorhandenen Nukleinsäure-Matrize (hier die first strand cDNA) synthetisiert. Die gesamte Reaktion basiert auf drei Teilschritten mit jeweils unterschiedlichen Temperaturen, die ständig wiederholt werden (Zyklen). In den verschiedenen PCR-Reaktionen wurden künstlich synthetisierte Oligonukleotidprimer verwendet, die zu den Sequenzen der LHRH-cDNA, der LHRH-Rezeptor-cDNA und der Sequenz von Glutaraldehyd-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH als Haushaltsgen) komplementär waren und die zu amplifizierenden Fragmente begrenzten. Die Amplifikation erfolgte dabei in 30-35 Zyklen mit den oben erwähnten drei Reaktionsschritten. Im ersten Reaktionsschritt, der

Denaturierung der DNA-Doppelstränge durch Erhitzen für 2 min auf 94°C, wird die DNA in Einzelstränge aufgeschmolzen. Beim Annealing, dem zweiten Reaktionsschritt, hybridisieren die Oligonukleotidprimer mit den beiden DNA-Matrizensträngen und dienen damit im dritten Schritt, der Polymerisation der Taq-DNA-Polymerase, als Startmoleküle zur Kopierung der beiden Matrizenstränge. In jedem Zyklus verdoppelt sich dabei die Menge des von den Startermolekülen eingerahmten Matrizenfragments und wird im folgenden Zyklus zum Ausgangsmaterial (exponentielle Amplifikation und Zahl der Duplikate: 2^n mit n = Anzahl der Zyklen). Die angewandten Annealing-Temperaturen der Oligonukleotidprimer lagen je nach Primerpaar zwischen 54°C und 60 °C und wurden für 1 min beibehalten. Die im dritten Reaktionsschritt von den Primern ausgehende Polymerisation der Doppelstränge erfolgte bei dem Temperatur-Optimum der Taq-Polymerase (72°C; Fa. Boehringer) für 1 min.

Amplifiziert wurden jeweils 2 µl (ca. 1,0 ng DNA) des cDNA-Ansatzes in einem 50 µl Reaktionsansatz, der sich wie folgt zusammensetzte:

dNTP's (Fa. Boehringer) je	200 µmol/L
Primer je	1,0 µmol/L
Taq-Polymerase	1,25 Units
TRIS-HCl pH 8,3	10 mmol/L
KCl	50 mmol/L
MgCl ₂	1,5 mmol/L

Der Reaktionsansatz wurde in spezielle 0,5 ml PCR-Reaktions-Tubes (Fa. Perkin-Elmer) pipettiert und die DNA in dem Perkin Elmer Thermo-Cycler 2400 amplifiziert.

2.4.2.3. Oligonukleotid-Primer

Zum Nachweis von LHRH-Rezeptor-mRNA:

Nr.	Sense Antisense-Primer	Position [bp]	Annealing	Produkt	Referenz
1	5'-GCT TGA AGC TCT GTC CTG GGA3' 5'-CCT AGG ACA TAG TAG GG3'	31-51 915-899	54°C	884 bp	Kakar et al. 1992
2	5'-AGT CCA ATG GTA TGC TGG AGA3' 5'-ACC CGT GTS AGG GTG AA3'	367-387 777-761	60°C	417 bp	Völker et al. 1998

Zum Nachweis von LHRH-mRNA:

Nr.	Sense Antisense-Primer	Position [bp]	Annealing	Produkt	Referenz
3	5'-TGT CCT TCA CTG TCC TTG CCA TCA C3' 5'-TTT CCC CTG TTG TGG ATT GGT CTT C3'	328-352 748-724	56°C	421 bp	Seeburg et al. 1984
4	5'-GCA AGC CAG CAA GTG TCT G3' 5'-GCA ACT TGG TGT AAG GAT3'	904-924 1478-1461	54°C	574 bp	Seeburg et al. 1984

Zum Nachweis von GAPDH-mRNA:

Nr.	Sense Antisense-Primer	Annealing	Produkt	Referenz
5	5'-CCA CCC ATG GCA AAT TCC ATG GCA3' 5'-TCT AGA CGG CAG GTC AGG TCC ACC3'	60°C	356 bp	Stratagene Heidelberg

2.4.2.3.1. Aufarbeitung HPLC-gereinigter Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotidprimer wurden in der Mikrochemischen Einheit des Institutes für Molekularbiologie und Tumorforschung der Philipps-Universität Marburg synthetisiert. Die bei der Synthese mit entstandenen unvollständigen n-1 Oligonukleotide, die sich auf viele Synthesereaktionen störend auswirken, wurden wie folgt vom Hauptprodukt abgetrennt. Die Oligonukleotide wurden zunächst über eine hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatographie) gereinigt. Die für diese Aufreinigung notwendige Trityl-Schutzgruppe mußte im Anschluß jedoch wieder abgespalten werden. Dazu wurde das tritylierte Oligonukleotid in der Vakuumzentrifuge eingedampft, in 1,5 ml Ammoniak (75%) aufgenommen und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Probe in jeweils 200 µl pro Eppendorf-Tube portioniert und erneut in der Vakuumzentrifuge eingedampft. Anschließend wurden in jedes Eppendorf-Tube 12,5 µl DEPC-Wasser pipettiert und auf einem Schüttler 30 min kräftig geschüttelt. Die so gereinigten und gelösten Oligonukleotidprimer wurden gepoolt, die Konzentration bestimmt und auf eine Stammkonzentration von 0,5 µg/µl verdünnt. Letztlich wurden die gelösten Primer in 50 µl Portionen bei -20°C gelagert.

2.4.3. Agarose-Gelelektrophorese

Agarose-Gelsysteme dienen sowohl zur Auftrennung und Analyse als auch zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten (Nukleinsäurefragmente). Durch die Variation der Agarosekonzentration können lineare DNA-Fragmente der Größe 0,1 bis 60 kb separiert werden (Ausubel et al. 1991). Da die Geschwindigkeit der Migration von Nukleinsäuremolekülen durch das Gel von der Größe der Fragmente und von der Dichte der Gelmatrix abhängig ist, wurden für die optimale Auftrennung je nach Trennungsproblem Agarose-Konzentrationen von 0,5-2,0 % (w/v) gewählt. Zur Anfärbung der Nukleinsäurefragmente wurde Ethidiumbromid (EtBr-Lösung $c = 5 \text{ mg/ml}$, Fa. Merck, Darmstadt) verwendet. Das Ethidiumbromid interkaliert zwischen den Basen der Nukleinsäuren, und nach Anregung mit UV-Licht bei 312 nm erscheint der Ethidiumbromid-Nukleinsäure-Komplex im sichtbaren Bereich als leuchtende Bande. Als Elektrophorese-Puffer (Laufpuffer und Gelpuffer) wurde ein TBE-Puffer mit folgender Zusammensetzung benutzt:

89	mmol/L	TRIS-Borsäure pH 8,0
2	mmol/L	EDTA

Für die durchgeführten horizontalen Agarose-Gelelektrophoresen wurden kommerzielle Gelkammern (MiniCell EC370M, MidiCell EC350, Fa. E-C Apparatus Corporation) verwendet. Die Agarose (Low Electro-Endosmosis, Fa. Gibco) für ein 1 %iges Gel wurde eingewogen und durch Aufkochen in der Mikrowelle in dem TBE-Puffer gelöst. Nach kurzem Abkühlen wurde Ethidiumbromid in einer Konzentration von $0,2 \text{ } \mu\text{g/ml}$ – dies entspricht $2 \text{ } \mu\text{l}$ einer Ethidiumbromidlösung $c = 5 \text{ mg/ml}$ für 50 ml Agaroselösung - in die Agarose-TBE-Lösung eingebracht und das flüssige Gel in den vorbereiteten Schlitten 0,5 cm hoch gegossen. Nach der Auspolimerisation des Gels wurden der Probenkamm und die Stopper entfernt, der Gelschlitten in die Kammer eingesetzt und die Kammer mit TBE-Puffer gefüllt, bis das Gel bedeckt war. Inzwischen wurden jeweils $10 \text{ } \mu\text{l}$ Probenvolumen (100 – 500 ng DNA pro Spur) mit $2 \text{ } \mu\text{l}$ Probenpuffer versetzt. Der Probenpuffer, der als Farbstoffmarker fungiert, um die erforderliche Trennstrecke zu charakterisieren (Bromphenolblau wandert etwa wie ein lineares doppelsträngiges 300 bp-DNA-Fragment und Xylencyanol wie ein lineares doppelsträngiges 4 kbp-DNA-Fragment) setzte sich wie folgt zusammen:

890	mmol/L	TRIS-Borsäure pH 8,0
20	mmol/L	EDTA
0,25	% (w/v)	Bromphenolblau (Fa. Serva)
0,25	% (w/v)	Xylencyanol (Fa. Serva).

Anschließend wurden jeweils 10 µl des Probe-Probenpuffer-Gemisches vorsichtig in die Geltaschen pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte konstant bei 120 V (~ 35 mA). Zur Dokumentation wurde das Gel direkt nach der Auftrennung (~ 30 min) auf einen UV-Transilluminator (Fa. Biometra) gebracht, die Banden bei 312 nm UV-Licht sichtbar gemacht und das Ergebnis mit einer Polaroid-Kamera (ADR Ultrasound CM-5, Fa. Polaroid Corporation, USA) festgehalten.

2.4.4. Restriktionsanalysen

Alle Experimente mit den verschiedenen Restriktionsendonukleasen wurden in den vom Hersteller (Fa. Boehringer, Mannheim) mitgelieferten Puffer durchgeführt. Bei den Analysen wurden jeweils 0,3-1,0 µg DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 5-10 U Enzym verdaut. Die Spaltung erfolgte bei 37°C für 2-3 h. Die Ergebnisse wurden anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft und dokumentiert.

2.4.5. Southern Blot

Das verwendete System der Southern-Blot-Hybridisierungen basiert auf der Methode von Renz und Kurz (1984) für die direkte Markierung von DNA mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (Horse Raddish Peroxidase; HRP). Eingesetzt wurde bei unseren Versuchen das ECL-Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System der Fa. Amersham (RPN 3000).

Für die Präparation der cDNA-Sonde wird das Enzym mit Hilfe von Glutyaldehyd kovalent über Aminogruppen an die denaturierte DNA gebunden. Die Meerrettichperoxidase katalysiert anschließend die Oxidation des eingesetzten Substrates Luminol, das dadurch in einen angeregten Zustand überführt wird und während der Rückkehr in den Grundzustand Blaulicht emittiert. Mit einem geeigneten blaulicht-sensitiven Film wird das emittierte Licht in Gegenwart eines Enhancers detektiert (Whitehead et al. 1983).

Zur Durchführung der Southern-Blot-Analyse wurden neben den in gebrauchsfertigen Zustand gelieferten Reagenzien für die Markierung von DNA, dem Hybridisierungspuffer mit Blocking-Reagenz und den Detektionsreagenzien folgende Lösungen benötigt:

<u>Denaturierungs-Lösung:</u>	NaCl	1,5 mol/L
	NaOH	0,5 mol/L
<u>Neutralisierungs-Lösung:</u>	NaCl	1,5 mol/L
	TRIS-HCl pH 7,5	0,5 mol/L
<u>Waschpuffer I:</u>	0,4 %	SDS
	0,5 %	SSC
<u>Waschpuffer II:</u>	20 x	SSC

Zunächst wurden die zu analysierenden Proben durch Agarose-Gelelektrophorese (vgl. 2.4.3.) aufgetrennt. Anschließend wurde die DNA durch Inkubation in 250 ml Denaturierungs-Lösung für 30 min unter Schütteln denaturiert. Nach der Denaturierung wurde das Gel kurz mit Aqua Bidest abgespült und durch 30 min Inkubation in 250 ml Neutralisierungs-Lösung ebenfalls unter schütteln neutralisiert.

2.4.5.1. Kapillarblot

Der Transfer der DNA aus den Agarose-Gelen auf Nylon-Filter (Hybond-N⁺-Membran, Fa. Amersham) erfolgte durch einen Kapillarblot. Der Versuchsaufbau ist schematisch in der Abbildung Abb. II-1 dargestellt. In eine Glasschale, die mit 20 x SSC gefüllt war, wurde eine Glasplatte auf Füße gestellt. Doppellagig zugeschnittenes kurz in 20 x SSC eingelegtes Filterpapier (Whatman 3MM-Papier) wurde nun derart über die Glasplatte gelegt, daß die Enden in den Puffer eintauchten. Das vorbereitete Gel wurde luftblasenfrei auf die Pufferbrücke gelegt. Die auf die Gelgröße zugeschnittenen Hybond-N⁺-Membran wurde vorher einige Minuten gewässert und kurz in 20 x SSC getaucht, bevor sie auf das Gel aufgebracht wurde. Anschließend wurden wiederum drei Lagen Whatman-Filterpapier und mehrere Lagen Zellstoff (mindestens 5 cm Höhe) sowie eine Glasplatte gelegt. Der gesamte Aufbau wurde letztlich mit einem Gewicht (ca. 500 g) beschwert.

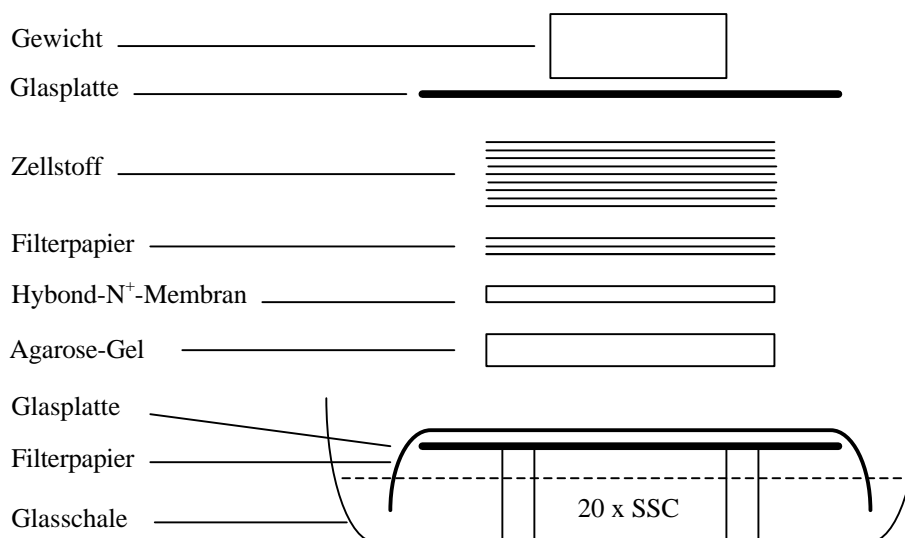


Abb. II-1: Schematischer Aufbau des Kapillarblots zur Southern-Blot-Analyse.

Das Blotting erfolgte grundsätzlich über Nacht (ca. 16 h) bei RT. Danach wurde der Nylon-Filter kurz in 6 x SSC-Puffer gewaschen, um anhaftende Gelreste zu entfernen und an der Luft getrocknet (ca. 30 min). Zur Fixierung der DNA an die Nylonmembran wurde die Membran anschließend für 2 h bei 80°C im Ofen gebacken.

2.4.5.2. Prähybridisierung

Die Prähybridisierung der DNA wurde in ECL-Goldpuffer, dem 5 % (w/v) Blocking Reagenz und 0,5 mol/L NaCl zugesetzt waren, durchgeführt. Dabei wurde ein Volumen von etwa 0,25 ml/cm² Membran eingesetzt. Zum Abblocken unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran auf die Pufferoberfläche gelegt und vorsichtig untergetaucht, sobald sie vollständig mit Flüssigkeit getränkt war. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 42°C im schüttelnden Wasserbad.

2.4.5.3. Markierung der cDNA-Sonden mit Meerrettichperoxidase

Die cDNA-Sonden wurden immer frisch markiert, wobei immer eine minimale Menge von 100 ng DNA markiert wurde. Die zu markierende DNA lag in einer Konzentration von 10 ng/ml gelöst in Aqua Bidest vor .

Nach Inkubation für 5 min im kochenden Wasserbad wurde die DNA 5 min auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation (5 s bei 10.000 x g) in einer Eppendorf-Tischzentrifuge wurde die gleiche Volumenmenge an DNA-Labeling Reagent zugegeben und die Probe vorsichtig gemischt. Jetzt wurden 0,5 Volumenanteile Glutaraldehydlösung zu der Probe pipettiert, wiederum gemischt, kurz zentrifugiert und die Lösung 10 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Eine so präparierte Probe der cDNA konnte vor der Verwendung 10-15 min auf Eis gelagert werden.

2.4.5.4. Hybridisierung

Von der Prähybridisierungslösung wurde 1 ml abgenommen und die markierte cDNA-Sonde damit vermischt. Die Lösung wurde wieder in das Hybridisierungsgefäß zurückgegeben, wobei der Filter jedoch nach Möglichkeit nicht direkt damit benetzt wurde. Die anschließende Inkubation erfolgte wie oben bereits erwähnt über Nacht bei 42°C im schüttelnden Wasserbad.

Am folgenden Tag wurde die so hybridisierte Membran in ein neues sauberes Gefäß gelegt und mit vorgewärmten (55°C) Waschpuffer I (mindestens 2 ml/cm² Membran) gewaschen. Für jeweils weitere 20 min wurde die Membran im Anschluß daran bei 55°C inkubiert und gewaschen. Nachdem die Membran wiederum in ein sauberes Gefäß überführt worden war, wurde sie für mindestens 15 min zweimal mit Waschpuffer II (2 ml/cm² Membran) inkubiert

2.4.5.5. Detektion

Zum Abfließen von überschüssigem Waschpuffer wurde die Membran für 1 min auf Zellstoff gelegt. Währenddessen wurden die Detektionsreagenzien im Verhältnis 1:1 (v/v) gemischt. Mit dieser Lösung wurde die Seite der Membran, die die DNA trug für exakt 1 min bedeckt. Anschließend wurde die Membran umgehend sorgfältig in Klarsichtfolie eingeschlagen, in eine Filmkassette gelegt und ein Blatt Hyperfilm-ECL (Fa. Amersham) aufgelegt. Die

Kassette wurde geschlossen und der Film dann exakt für 1 min exponiert, dann ein zweiter Film eingelegt und die Kassette erneut geschlossen

2.4.5.6. cDNA-Sonden

Die cDNA-Sonden, die in der Southern-Blot-Hybridisierung eingesetzt wurden, dienten dem Nachweis der mRNA des humanen LHRH beziehungsweise der des humanen hypophysären LHRH-Rezeptors in den aus Tumorzelllinien und primärem Tumormaterial isolierter RNA.

LHRH-cDNA (human)

Die cDNA für das humane LHRH wurde freundlicherweise von P.H. Seeburg (Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Abgeleitet wurde diese cDNA von der Sequenz des plazentären LHRH und in den Vector pUC 11 kloniert (Seeburg und Adelman 1984). Das Fragment besteht aus 380 Basenpaaren (Nukleotide 973 bis 1353) und wurde zwischen einer Pst I und einer Eco RI-Schnittstelle inseriert.

LHRH-Rezeptor-cDNA (human)

Die cDNA für den humanen LHRH-Rezeptor, aus der menschlichen Hypophyse kloniert, wurde von S. S. Kakar (University of Alabama at Birmingham, USA) zur Verfügung gestellt. Die cDNA hat eine Länge von 1560 bp, beinhaltet die komplette kodierende Sequenz (Nukleotide 56 bis 1042) und wurde mit Eco RI aus dem Vektor exzidiert. Als Vektor diente das Phagemid pcDNA 1 (Kakar et al. 1992).

2.4.6. Quantitative RT-PCR

Mit der quantitativen RT-PCR wurde die Verminderung der m-RNA-Expression für den LHRH-Rezeptor unter der Einwirkung des LHRH-Agonisten Triptorelin und des LHRH-Antagonisten Cetrorelix in den Ovarialkarzinomzelllinien EFO-21 und EFO-27 sowie den Endometriumkarzinomzelllinien Ishikawa und HEC-1A untersucht. Die Quantifizierung erfolgte in einer semiquantitativen kompetitiven RT-PCR-Analyse unter Verwendung des Primerpaares Nr. 2 und eines synthetisierten internen Standards. Der interne Standard wurde

von der Mikrochemischen Einheit des Institutes für Molekularbiologie und Tumorforschung der Philipps-Universität Marburg synthetisiert und stellte ein Ausschnitt der original LHRH-Sequenz (bp 364-460 und daran anschließend bp 695-780) dar, das von den entsprechenden Primerpaar-Bindungsstellen flankiert war und ein Amplifikationsprodukt von 187 bp in der RT-PCR lieferte.

TAC AGT CCA ATG GTA TGC TGG AGA GTT ACT CTG CAA AGT TCT CAG

Primer Nr. 2 Sense Bindungsstelle

TTA TCT AAA GCT TTT CTC CAT GTA TGC CCC AGC CTT CAT GAT GGT

GGT GAT CTT CAC CTT CAG CTG CCT CTT CAT CAT CCC TCT TTT CAT

CAT GCT GAT CTG CAA TGC AAA AAT CAT CTT CAC CCT GAC ACG GGT

Primer Nr. 2 Antisense Bindungsstelle

CCT

Abb. II-2: Basensequenz des internen Standards für die Quantitative RT-PCR mit den dazugehörigen Primer-Bindungsstellen.

Im Einzelnen wurden die Zellen gleichmäßig so in Zellkulturflaschen mit MEM-Medium ausgesät, daß für jeden Tag des Versuchs (24-96 h) eine Flasche als Kontrolle und eine Flasche unter LHRH-Analoga Einfluß vorhanden war. Nach einer Anwachsphase von zwei Tagen in allen Flaschen wurde das Medium gewechselt und gleichzeitig die Kontrollen mit PBS und die Versuchsflaschen mit der entsprechenden Konzentration von Triptorelin und Cetorelix (wirksame Konzentration je Flasche 10^{-5} mol/L) für die Zeiten 24, 48, 72 und 96 h inkubiert. Auch zum Zeitpunkt 0 h wurde ein Kontrollflasche abtrypsiniert und entsprechend dem Protokoll (vgl. 2.4.1.1.) Gesamt-RNA gewonnen. Genauso wurde an den entsprechenden Zeitpunkten verfahren und jeweils sofort anschließend die Gesamt-RNA sorgfältig isoliert und bis zur cDNA-Synthese bei -20°C gelagert. Dieser Versuchsansatz wurde für jede Zelllinie und für jedes der beiden LHRH-Analoga in einer Dreifachbestimmung durchgeführt. Nach Abschluß dieses Versuchsansatzes wurden die einzelnen Gesamt-RNA Proben im

GeneQuant II quantifiziert und in den anschließenden cDNA-Synthese-Reaktionen jeweils die definierte Menge von 4 µg/7,6 µl eingesetzt und die RNA in cDNA umgeschrieben.

In der nachfolgenden PCR (vgl. 2.4.2.2.) mit dem Primerpaar Nr. 2 wurden jeweils 2 µl der cDNA-Probe eingesetzt und zusätzlich der interne Standard in einer Konzentration, die eine gleichzeitige Amplifikation mit dem gewünschten LHRH-Rezeptor Amplifikat ermöglichte. Um einen quantitativen Unterschied der LHRH-Rezeptor mRNA-Expression detektieren zu können, wurde anstelle des Oligonukleotides dATP das kommerziell erworbene radioaktiv markierte α -³²P-dATP (Fa. Hartmann) eingesetzt. Nach der PCR wurden die Amplifikationsprodukte in einem Agarose-Gel aufgetrennt, die entsprechenden Banden mit Hilfe eines Skalpell sorgfältig herausgeschnitten und die einzelnen Banden in Szintillationsröhrchen im β -Counter (Beckman LS 1801, Fa. Beckman) gemessen. Die so gemessenen Werte wurden in Relation zu dem Wert des internen Standards gesetzt und auf den Wert 1 relativiert. Anschließend wurden die erhaltenen Werte für die einzelnen Behandlungen mit den täglichen dazugehörigen Kontrollen verglichen und die entsprechende prozentuale Abnahme ermittelt. Aus den jeweiligen drei Versuchsansätzen wurde statistisch letztendlich der Mittelwert mit der dazugehörigen Standardabweichung bestimmt.

2.4.7. Western Blot

Die Western Blot Technik soll klären, ob die LHRH-Analoga Triptorelin und Cetrorelix in Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien (EFO-21, EFO-27, Ishikawa, HEC-1A) innerhalb des Signaltransduktionsweges die EGF-induzierte Tyrosinphosphorylierung des EGF-Wachstumsfaktorrezeptors inhibieren. In einem Zellkulturansatz wurden die Zellen mit EGF unter gleichzeitiger Behandlung mit LHRH-Analoga inkubiert und anschließend aus den Zellen Plasmamembranproteine präpariert. Die Proteine wurden mit SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese aufgetrennt und in einem Semi-Dry-Immunoblot auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Nach Absättigung der Membran wurde diese mit dem spezifischen Antikörper Anti-Phosphotyrosine (pAb), IgG (Fa. Promega) inkubiert und die Immunreaktion mit einem Peroxidase-markierten Zweitantikörper nachgewiesen. Die Detektion des Antikörpers erfolgt auf der Basis der Chemolumineszenz (ECLTM Western blotting, Fa. Amersham). Die Methode ist detailliert bei Lee et al. 1991 beschrieben und erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.4.7.1. Präparation der Proben und Inkubationsansatz der Zellkultur

Für den Versuch zum Nachweis der LHRH-induzierten Inhibition der EGF-induzierten Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptors wurden die Ovarialkarzinomzelllinien EFO-21 und EFO-27 sowie die Endometriumkarzinomzelllinien Ishikawa und HEC-1A zunächst gleichmäßig in Zellkulturflaschen (125 cm²) ausgesät. Nach dem Erreichen einer 70-80 %igen Konfluenz wurden die Zellen 72 h in phenolrot- und serumfreien MEM-Medium weiterkultiviert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und zweimal sorgfältig mit 10 ml frischem phenolrot- und serumfreien MEM-Medium gespült. Danach wurden die Flaschen mit EGF (10⁻⁷ mol/L) für 15 min in Anwesenheit oder Abwesenheit der LHRH-Analoga Triptorelin oder Cetrorelix (10⁻⁵ mol/L) inkubiert. Sofort anschließend wurden die Zellen mit 3 ml Lyse-Puffer (160 mmol/L TRIS/HCl pH 6,7, 200 mmol DTT, 4 % SDS, 20 % Glycerin und 0,004 % Bromphenolblau) vom Boden abgeschabt. Die viskose Suspension wurde dann zunächst zweimal durch eine 20 gauge Kanüle und später fünfmal durch eine 26 gauge Kanüle geschert. Die so präparierten Proben wurden in 100 µl Portionen bei -80°C gelagert.

2.4.7.2. SDS-Gelelektrophorese

Die aufgetauten Proben aus 2.4.7.1. wurden bei der Probenvorbereitung zunächst in SDS-Probenpuffer (Lyse-Puffer) denaturiert und durch das SDS in Polyanionen überführt. Die Trennung der Proteine erfolgte bei der Elektrophorese in den SDS-Gelen aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekulargewichte. Die SDS-Gelelektrophorese erfolgte nach der Anleitung von Bertram und Gassen (1991) in einer Western Blot Acrylamid-Gelkammer (Fa. Von Keutz) in einem Gel, das sich aus einem Trenngel (7,5 % Acrylamid) und einem Sammelgel (4 % Acrylamid) zusammensetzte.

Im Einzelnen wurden für die SDS-Gelelektrophorese folgende Lösungen benötigt:

Lösung I: Rotiphorese Gel 30 (29,2 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid; Fa. Roth)

Lösung III: 1,5 mol/L TRIS-HCl, pH 8,8

Lösung IV: 0,5 mol/L TRIS-HCl, pH 6,8

Lösung V: 10 % SDS-Lösung

APS: 10 % Ammoniumperoxodisulfat-Lösung

TEMED: TEMED-Lösung (Fa. Serva)

Elektrophoresepuffer: 0,025 mol/L TRIS
0,192 mol/L Glycin
0,1 % SDS

Die gewünschte Trenngellösung (7,5 %) wurde gemischt (4,85 ml Aqua Bidest, 2,5 ml Lösung III, 100 µl Lösung IV, 2,5 ml Lösung I, 50 µl APS, 5 µl TEMED) und luftblasenfrei zwischen die Glasplatten der Gel-Kammer bis ca. 2 cm unter den oberen Rand eingefüllt und auspolymerisieren lassen (1-2 h). Anschließend wurde die Sammelgellösung (4 % Gel; 0,125 mol/L TRIS pH 6,8) gemischt (3,0 ml Aqua Bidest, 1,25 ml Lösung IV, 50 µl Lösung V, 650 µl Lösung I, 25 µl APS, 5 µl TEMED) und bis zum oberen Rand der Gelkammer eingegossen, sofort die Schablone für die Probestaschen eingesetzt und ebenfalls auspolymerisieren lassen (30-60 min). Die Schablone wurde entfernt, das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit dem Elektrophorese-Puffer gefüllt. In der Zwischenzeit wurden die aufgetauten Proben (vgl. 2.4.7.1.) bei 95°C für 5 min denaturiert und durch den Elektrophorese-Puffer hindurch in die Taschen gefüllt. Anschließend erfolgte die Trennung der Proteine unter den Elektrophoresebedingungen mit 200 V für 45-60 min.

2.4.7.3. Semi-Dry-Immunoblot mit Kohlenstoffelektroden (Western Blotting)

Der Transfer der in dem SDS-Gel aufgetrennten Proteine erfolgte mit Hilfe des Semi-Dry-Immunoblot-Verfahren nach Bertram und Gassen (1991) auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond-ECL, Fa. Amersham), das den schnellsten und vollständigsten Transfer ermöglichte. Der Aufbau der Semi-Dry-Blot-Apparatur ist in der Abbildung Abb. II-3 dargestellt und wurde in einer Blotting Kammer (Graphit LKS, Fa. Pharmacia LKB Bromma) durchgeführt.

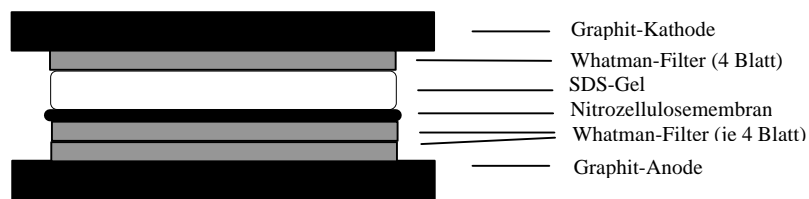


Abb. II-3: Schematischer Aufbau der Semi-Dry-Immunoblot-Apparatur

Zur Durchführung des Semi-Dry-Blots wurden die folgenden Lösungen benötigt, wobei diese niemals titriert werden durften:

Kathodenpuffer (pH 9,4):	0,04 mol/L	Amino-u-Capronsäure
	0,025 mol/L	TRIS
	20 %	Methanol
Anodenpuffer (pH 10,4):	0,03 mol/L	TRIS
	20 % ml	Methanol
Konz. Anodenpuffer (pH 10,4):	0,2 mol/L	TRIS
	20 %	Methanol
Transferpuffer (pH 8,3):	0,025 mol/L	TRIS
	0.192 mol/L	Glycin
	20 %	Methanol

Zunächst wurden die NC-Blottingmembran und 12 Whatman 3MM-Filterpapiere auf die entsprechende Gelgröße zurechtgeschnitten. Das SDS-Gel wurde anschließend für 15 min in 100 ml Transferpuffer äquilibriert und das Blotting-Sandwich wie in Abb. II-2 dargestellt aufgebaut. Nacheinander wurden 4 in Konz. Anodenpuffer getränkte als Stapel gefolgt von 4 in Anodenpuffer getränkte Whatman 3MM-Filterpapiere auf die Anode gelegt und die NC-Membran auf den Filterpapierstapel aufgelegt. Als nächstes wurde das SDS-Gel mit Transferpuffer abgespült und luftblasenfrei auf die NC-Membran aufgebracht, mit 4 in Kathodenpuffer getränkten Whatman 3MM-Filterpapieren bedeckt und mit der Graphit-Kathode abgedeckt. Das eigentliche Blotting erfolgte für 90 min mit einem konstanten Strom

(0,8 mA/cm²) bei Raumtemperatur. Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran mit einer stumpfen Pinzette entnommen und mit der dem Gel zugewandten Seite nach oben zur Absättigung in eine Schale mit 50 ml TBS-T-Puffer (0,15 mol/L NaCl, 0,01 mol/L TRIS, 0,001 mol/L NaN₃, 0,05 % Tween[®] 20) für mindestens 90 min überführt.

2.4.7.4. Immunreaktion und Detektion

Nach dem Absättigen der NC-Membran in dem TBS-T-Puffer wurde die Immunreaktion nach den Angaben des Herstellers mit dem ECL Western blotting Protokoll (RPN 2106, Fa. Amersham) durchgeführt. Als Erstantikörper wurde hierbei der polyklonale Anti-rabbit Antikörper Anti-Phosphotyrosine (pAb), IgG (Fa. Promega) verwendet, der eine 170 kDa Bande des phosphorylierten EGF Rezeptors (vgl. Produktinformationen Fa. Promega) detektierte. Die für die Immunreaktion optimale Antikörper-Konzentration lag bei einer Verdünnung von 5 µg/ml.

Das Sichtbarmachen und die Detektion des phosphorylierten EGF-Rezeptor-Erstantikörper-Immunkomplexes erfolgte mit Hilfe eines mit Meerrettichperoxidase markierten Zweitantikörpers (ECL Western blotting system), der gegen den im Immunkomplex gebundenen Erstantikörper (Anti-Rabbit) gerichtet war. Durch die entstandene Chemolumineszenz konnte das Signal auf der NC-Membran auf einen Film (Hyperfilm-ECL, Fa. Amersham) übertragen werden., wobei die Belichtungszeiten des Filmes zwischen 15 und 30 sec lagen.

Die quantitative Auswertung der Banden erfolgte mit der Kodak Digital Science 1D Image Analyse Software, wobei mit dem Programm die Intensitäten der Banden ermittelt wurden. Durch jeweils drei unabhängige Western Blot Analysen pro Zelllinie und Stimulation einschließlich Kontrolle wurde so die Abnahme der wachstumsfaktorinduzierten EGF-Rezeptor-Tyrosin-Phosphorylierung in Anwesenheit oder Abwesenheit der LHRH-Analoga Triptorelin und Cetrorelix im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle detektiert.

2.5. *Patientinnenkollektiv*

Neben den Tumorzelllinien unter Zellkultur wurden in dieser Arbeit auch chirurgisch resezierte Primärtumoren oder Tumormetastasen des Ovars und Endometriums auf die Expression von LHRH und dessen Rezeptor auf Protein und mRNA-Ebene untersucht. In den

folgenden Kapiteln sind diese Gewebeproben aus datenrechtlichen Gründen durch Ziffern codiert, wobei diese Ziffern sich auf die nachfolgend numeriert aufgeführten Tumorproben mit den entsprechenden Charakteristiken beziehen (vgl. Tab. II-4).

Tab. II-4: Histologische Charakterisierung der chirurgisch resezierten Primärtumoren und Tumormetastasen des Ovars und Endometriums mit Bezifferung, klinischem Staging (I-IV nach FIGO) und histologischer Typisierung (Grade, G1-G3).

Nr.	Stage	Grade	Histologie
1	IV	G2	Papilläres Zystadenokarzinom des Ovars
2	II	G2	Muzinöses Zystadenom des Ovars
3	III	G2	Teils papillär, teils seröses Adenokarzinom des Ovars
4	I	G1	Papilläres gut differenziertes Ovarialkarzinom
5	III	G3	Solides Ovarialkarzinom
6	III	G3	Papilläres Ovarialkarzinom
7	IV	G3	Peritonealkarzinose eines Adenokarzinoms des Ovars
8	III	G3	Solides entdifferenziertes Ovarialkarzinom
9	IV	G3	Solides papilläres Adenokarzinom des Ovars
10	IV	G3	Papilläres Adenokarzinom des Ovars
11	IV	G3	Solides Adenokarzinom des Ovars
12	III	G2-G3	Papilläres Ovarialkarzinom
13	III	G2	Papillär seröses Ovarialkarzinom
14	II	G1	Seröses Adenokarzinom des Ovars
15	III	G2	Teils papilläres Adenokarzinom des Ovars
16	IV	G3	Teils papilläres Adenokarzinom des Ovars
17	IV	G3	Solides Adenokarzinom des Ovars
18	IV	G3	Teils papilläres wenig differenziertes Adenokarzinom des Ovars
19	III	G2	Solides Ovarialkarzinom
20	II	G2	Papilläres Adenokarzinom des Ovars
21	II	G2	Peritonealkarzinose eines Ovarialkarzinoms
22	III	G2	Papillär seröses Adenokarzinom des Ovars
23	III	G2-G3	Papilläres gut differenziertes Adenokarzinom des Ovars
24	IIIc	G2	Solides Adenokarzinom des Ovars
25	IV	G3	Peritonealkarzinose eines Adenokarzinoms des Ovars
26	IIIc	G3	Papillär seröses Ovarialkarzinom
27	III	G3	Peritonealkarzinose eines Adnexkarzinoms des Ovars
28	III	G3	Solides Ovarialkarzinom
29	IV	G3	Papilläres Adenokarzinom des Ovars
30	II	G2	Seröses Zystadenom des Ovars
31	III-IV	G3	Papilläres, teils seröses Adenokarzinom des Ovars
32	IV	G3	Teils papilläres, wenig differenziertes Adenokarzinom des Ovars
33	I	G1	Solides Endometriumkarzinom
34	III	G2	Serös papilläres Zystadenokarzinom des Endometriums
35	IV	G3	Solides, teils papilläres Endometriumkarzinom
36	III	G2	Papilläres Endometriumkarzinom
37	III	G2	Peritonealkarzinose eines soliden Endometriumkarzinoms
38	III	G2	Teils papilläres Endometriumkarzinom
39	IVa	G3	Metastasierendes Endometriumkarzinom
40	III	G2	Papilläres Endometriumkarzinom

Das klinische Staging (I-IV) erfolgte nach den Richtlinien der Internationalen Gesellschaft der Gynäkologie und Geburtshilfe (FIGO) (siehe Tab. I-1 und Tab. I-2). Die histologischen Typisierungen der Ovarialkarzinome wurden nach den Empfehlungen der WHO (Serov und Scully 1973) vorgenommen. Die Histologie und das Grading der Endometriumkarzinome erfolgte nach den Richtlinien der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (Dallenbach-Hellweg und Schmidt-Matthiesen 1984). Diese Typisierungen ergaben sich aus den Gutachten, die am Institut für Pathologie der Philipps-Universität Marburg erstellt wurden.

3. Ergebnisse

3.1. Lichtmikroskopischer Vergleich der Morphologie der Ovarialkarzinomzelllinien EFO-21 und EFO-27 und der Endometriumkarzinomzelllinien Ishikawa und HEC-1A

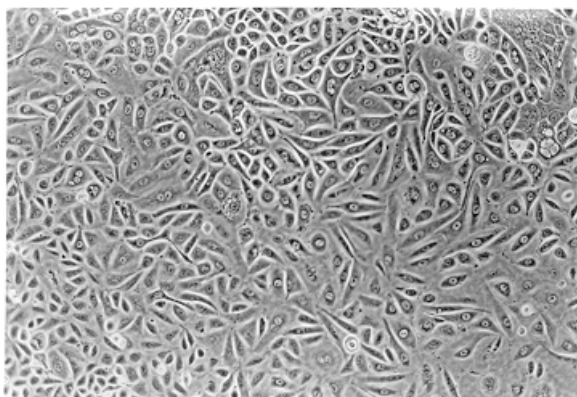
Grundlegend für alle Untersuchungen in vitro waren jeweils zwei experimentelle Modellsysteme für Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien. Die Morphologie der einzelnen Zellen ist durch lichtmikroskopische Bilder in den Abb. III-1 a) bis d) dargestellt. Dabei wachsen alle Zelllinien adhärent in einem Monolayer auf der Plastikoberfläche der Kulturgefäße, zeigen aber nach der Konfluenz eine Tendenz zur Ausbildung von turmartigen Strukturen. Diese klonale Expansion ist als solche charakteristisch für transformierte Zellen. Während die Ovarialkarzinomzellen unregelmäßig geformt sind und im subkonfluenten Zustand zur Ausbildung sogenannter Pseudopodien (fadenartige Auszüge) neigen, zeigen die Endometriumkarzinomzellen polygonale oder kubische Formen, die in ihrer Zusammensetzung noch deutliche epitheliale Züge tragen.

Vorangestellt ist hier die Legende zu den Abbildungen der Abb. III-1 auf der folgenden Seite.

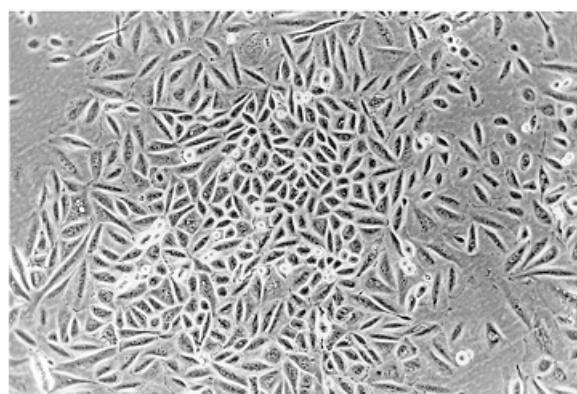
Abb. III-1: Lichtmikroskopischer Vergleich (Morphologie) der als experimentelle Modellsysteme fungierenden Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien.

- a) Zellkultur von EFO-21 in Passage 38, konfluente Kultur.
(Phasenkontrast, 200 fach)
- b) Zellkultur von EFO-27 in Passage 71, Konfluenter Zellmonolayer polymorpher Zellen.
(Phasenkontrast, 200 fach)
- c) Zellkultur von Ishikawa in Passage 34, unregelmäßiger Zellrasen mit teilweise dichten Aggregaten.
(Phasenkontrast, 200 fach)
- d) Zellkultur von HEC-1A in Passage 134, Zellmonolayer mit charakteristischem, polygonal-kompaktem Wachstum.
(Phasenkontrast, 200 fach)

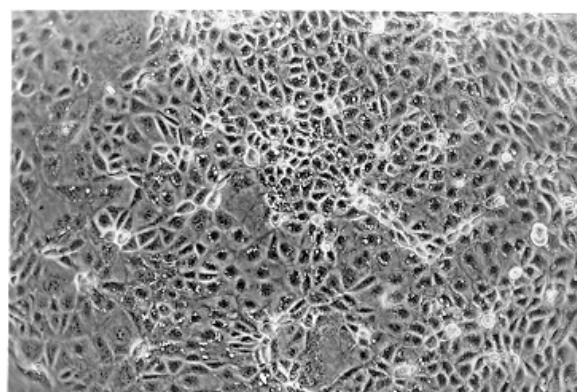
a)



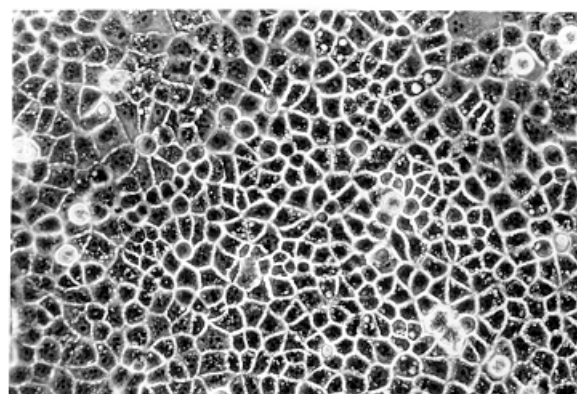
b)



c)



d)



3.2. Proliferationsassays von Zellen in Kultur unter Einfluß der LHRH-Analoga Triptorelin und Cetrorelix

Im Rahmen der Einarbeitung in den Umgang mit den Ovarial- und Endometrium-Karzinomzellkulturen und der Thematik der Manipulation des Proliferationsverhaltens von Tumorzelllinien durch LHRH-Agonisten und LHRH-Antagonisten wurden zunächst die Ergebnisse von Emons et al. (1993b, 1993c) bezüglich der zeit- und dosisabhängigen antiproliferativen Wirkung des LHRH-Agonisten [D-Trp⁶]LHRH (Triptorelin, syn. Decapeptyl) und des LHRH-Antagonisten [Ac-D-Nal(2)¹, D-Phe(4Cl)², D-Pal(3)³, D-Cit⁶, D-Ala¹⁰]LHRH (Cetrorelix, syn. SB-75) reproduziert. Die Durchführung dieser Proliferationsassays wurde unter 2.2.2.4. a) und b) beschrieben.

3.2.1. Zeit- und dosisabhängige Inhibition der Proliferation von EFO-21, EFO-27, Ishikawa und HEC-1A durch den LHRH-Agonisten Triptorelin

Die Untersuchungen der zeit- und dosisabhängigen Untersuchungen der antiproliferativen Wirkung von Triptorelin auf die Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien stimmten mit den von Emons et al. (1993b , 1993c) ermittelten Daten überein. Die Experimente zur Untersuchung der Beziehung zwischen Dosis und Wirkung erbrachten ebenfalls vergleichbare Ergebnisse. In der folgenden Tabelle Tab. III-1 sind die entsprechenden Proliferationshemmungen gegenüber der Kontrolle im zeitabhängigen Versuch nach 5 Tagen und in Abhängigkeit von der eingesetzten Dosis wiederzufinden:

Tab III-1: Proliferationsinhibition der Karzinomzelllinien durch [D-Trp⁶]LHRH (Triptorelin) in Abhängigkeit von der eingesetzten Dosis am Tag 5 Angegeben sind die Proliferationsraten als Mittelwert aus jeweils 4 Einzelassays in [% ± SD] der Kontrolle für die einzelnen Agonisten-Konzentrationen (10⁻¹¹ bis 10⁻⁵ mol/L).

Zelllinie	Proliferationsraten [% ± SD]				
	Kontrolle	10 ⁻¹¹ mol/L	10 ⁻⁹ mol/L	10 ⁻⁷ mol/L	10 ⁻⁵ mol/L
EFO-21	100 ± 2,6	84,1 ± 1,5	78,0 ± 2,2	70,8 ± 2,6	58,4 ± 2,5
EFO-27	100 ± 1,4	89,4 ± 1,5	80,3 ± 0,8	76,8 ± 2,8	69,7 ± 1,3
Ishikawa	100 ± 1,2	89,8 ± 2,1	77,8 ± 2,3	67,3 ± 1,7	63,0 ± 1,8
HEC-1A	100 ± 1,1	93,1 ± 1,2	76,2 ± 1,8	67,4 ± 2,1	56,8 ± 1,4

In der Abb. III-2 sind die zeit- und dosisabhängigen Effekte exemplarisch für die Ovarialkarzinomzelllinie EFO-21 und Endometriumkarzinomzelllinie HEC-1A graphisch dargestellt.

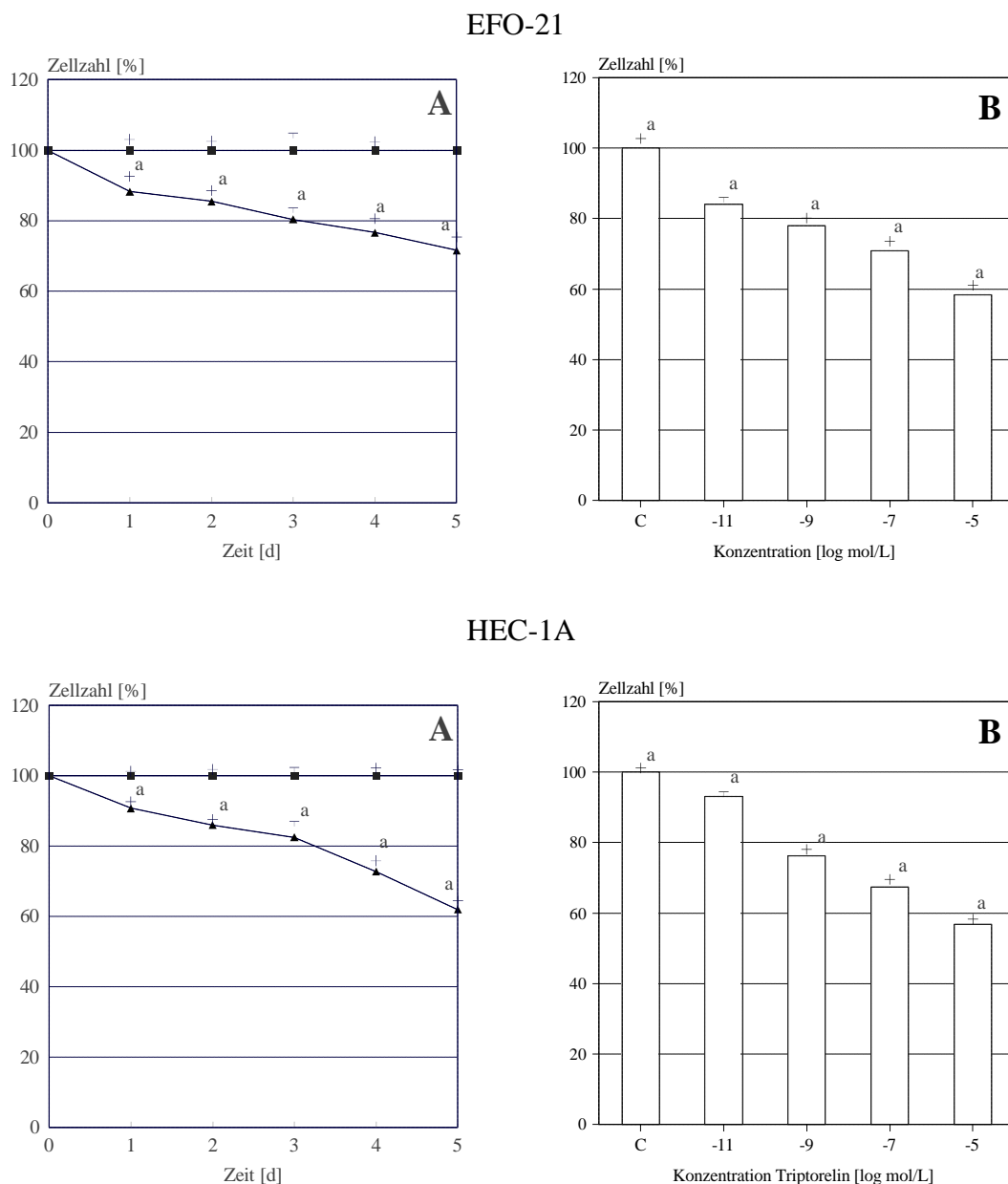


Abb. III-2: Zeit- und dosisabhängige Proliferationsinhibition durch Triptorelin in der Ovarialkarzinomzelllinie EFO-21 und Endometriumkarzinomzelllinie HEC-1A.

A) Effekte mit (▲)/ohne (■) Triptorelin (10^{-5} mol/L) über 5 Tage in [% \pm SD] der Kontrolle (C). Zugabe am Tag 0. a: $p < 0,001$; Mann Whitney U Test.

B) Effekte nach 5 Tagen Behandlung mit den ansteigenden Triptorelin-Konzentrationen (10^{-11} - 10^{-5} mol/L) in [% \pm SD]. a: $p < 0,001$ versus Kontrolle (C) Student-Newman-Keuls Test; ANOVA $p < 0,0001$.

In einer parallel zu dieser Arbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Emons durchgeführten medizinischen Dissertation von O. Schmidt wurde die proliferatorisch inhibitorische Wirkung des LHRH-Agonisten Triptorelin auf verschiedene andere humane Karzinomzelllinien untersucht. Signifikante Proliferationshemmungen zwischen 30 und 40 % konnten dabei in den Ovarialkarzinomzelllinien NIH: Ovar-3, BG-1 und den Endometriumkarzinomzelllinien HEC-1B, KLE, AN-3-CA sowie der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 nachgewiesen werden. Dementgegen zeigte Triptorelin bei den Ovarialkarzinomzelllinien SK-OV-3, SW 626 und der Endometriumkarzinomzelllinie MFE 296 keine signifikante Proliferationsinhibition.

3.2.2. Zeit- und dosisabhängige Inhibition der Proliferation von EFO-21, EFO-27, Ishikawa und HEC-1A durch den LHRH-Antagonisten Cetorelix

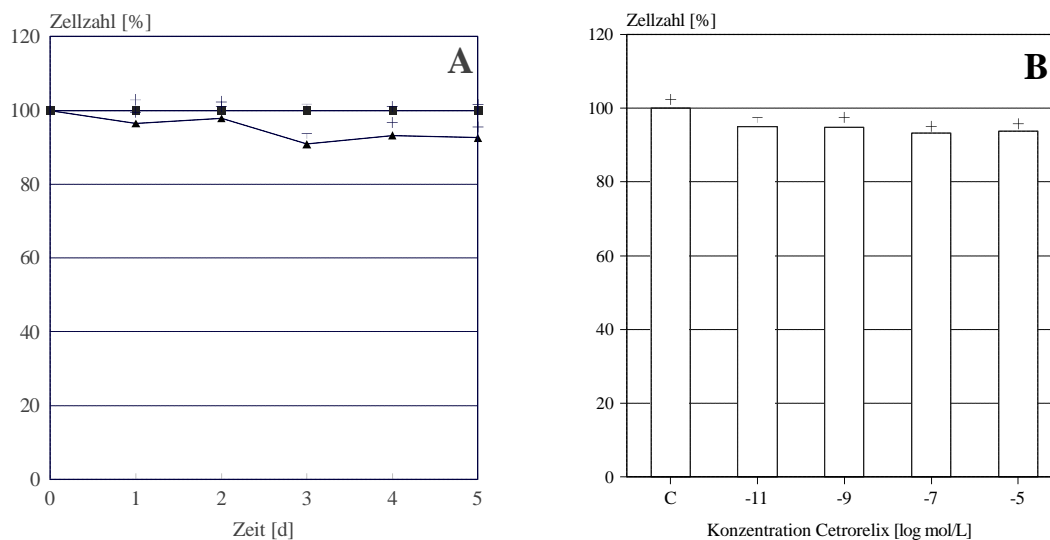
Auch die ermittelten zeit- und dosisabhängigen inhibitorischen Effekte des LHRH-Antagonisten Cetorelix (Tab. III-2) ergaben in etwa die gleichen Hemmungen wie in der Literatur beschrieben (Emons et al. 1993b, 1993c), wobei die inhibitorischen Effekt am Tag 5 nicht ganz so stark – etwa 5-10 % weniger – ausgeprägt waren, gegenüber denen mit dem LHRH-Agonisten Triptorelin. Bei den drei Zelllinien EFO-21, Ishikawa und HEC-1A wurde eine signifikante Zellzahlreduktion beobachtet. Dementgegen außergewöhnlich war die Tatsache, daß der LHRH-Antagonist Cetorelix bei der Ovarialkarzinomzelllinie EFO-27 (Abb. III-3) keine signifikante Proliferationsinhibition hervorrief, was aus der Literatur bekannt war (Emons et al. 1993b). In der Tabelle Tab. III-2 sind die entsprechenden Proliferationshemmungen gegenüber der Kontrolle im zeitabhängigen Versuch nach 5 Tagen und in Abhängigkeit von der eingesetzten Dosis wiederzufinden:

Tab III-2: Proliferationsinhibition der Karzinomzelllinien durch [Ac-D-Nal(2)¹, D-Phe(4Cl)², D-Pal(3)³, D-Cit⁶, D-Ala¹⁰]LHRH (Cetorelix) in Abhängigkeit von der eingesetzten Dosis am Tag 5. Angegeben sind die Proliferationsraten als Mittelwert aus jeweils 4 Einzelassays in [% ± SD] der Kontrolle für die einzelnen Antagonisten-Konzentrationen (10⁻¹¹ bis 10⁻⁵ mol/L).

Zelllinien	Proliferationsraten [% ± SD]				
	Kontrolle	10 ⁻¹¹ mol/L	10 ⁻⁹ mol/L	10 ⁻⁷ mol/L	10 ⁻⁵ mol/L
EFO-21	100 ± 4,2	92,6 ± 3,7	81,9 ± 3,5	69,3 ± 3,0	66,1 ± 3,6
EFO-27	100 ± 2,3	95,0 ± 2,4	94,8 ± 2,5	93,2 ± 1,8	93,7 ± 2,0
Ishikawa	100 ± 1,5	89,4 ± 1,6	80,3 ± 2,4	76,8 ± 1,5	69,7 ± 2,2
HEC-1A	100 ± 2,8	90,2 ± 2,2	83,2 ± 2,0	75,3 ± 2,3	70,1 ± 2,5

Die dazugehörigen zeit- und dosisabhängigen Effekte sind in der Abb. III-3 exemplarisch für die Ovarialkarzinomzelllinie EFO-27 (keine signifikante Inhibition) und Endometriumkarzinomzelllinie Ishikawa graphisch dargestellt.

EFO-27



Ishikawa

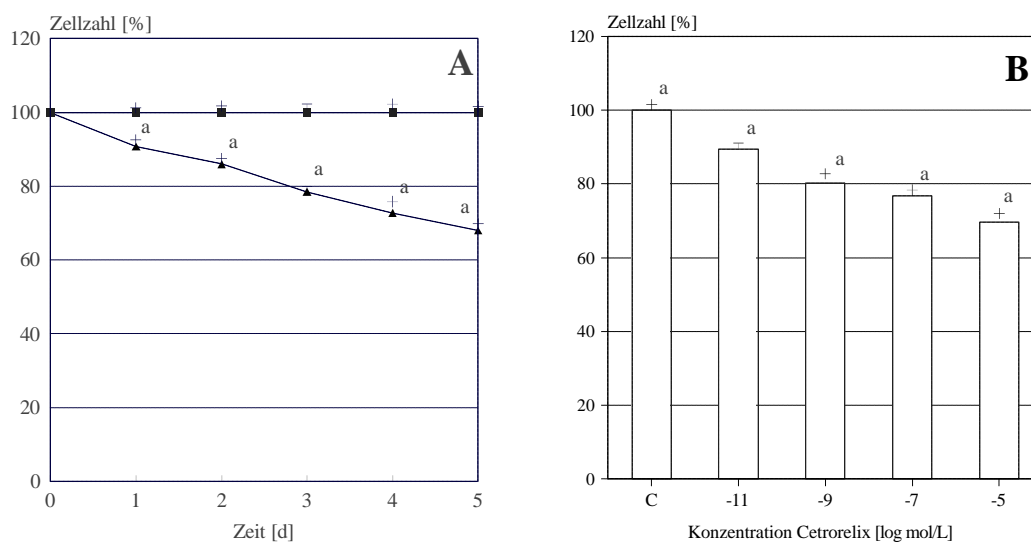


Abb. III-3: Zeit- und dosisabhängige Proliferationsinhibition durch Cetorelix in der Ovarialkarzinomzelllinie EFO-27 und Endometriumkarzinomzelllinie Ishikawa.

A) Effekte mit (▲)/ohne (■) Cetorelix (10^{-5} mol/L) über 5 Tage in [% \pm SD] der Kontrolle (C). Zugabe am Tag 0. a: $p < 0,001$; Mann Whitney U Test.

B) Effekte nach 5 Tagen Behandlung mit den ansteigenden Cetorelix-Konzentrationen (10^{-11} - 10^{-5} mol/L) in [% \pm SD]. a: $p < 0,001$ versus Kontrolle (C) Student-Newman-Keuls Test; ANOVA $p < 0,0001$.

3.3. Bestimmung von LHRH-Immunreaktivität in Zellkulturextrakten und in Tumorgewebeproben

Mit Hilfe des etablierten Radioimmunoassay (zur Durchführung vgl. 2.3.5.1.) wurden sowohl die Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien als auch die rezidierten Tumoren auf die Sekretion von LHRH oder eines LHRH-ähnlichen Peptids untersucht

3.3.1. Nachweis von LHRH-Immunreaktivität in Proteinextrakten aus Zelllinien

Von jeder Zelllinie wurden drei Proteinextrakte (vgl. 2.3.1.) hergestellt und im LHRH-RIA die Immunreaktivität bestimmt. Die Ergebnisse der Messungen sind in der Tabelle Tab. III-3 zusammengefaßt.

Tab. III-3: Quantifizierung der LHRH-Immunreaktivität aus Zellextrakten im RIA (-, keine Immunreaktivität detektiert).

Zelllinie	LHRH-Immunreaktivität [pg / 10 ⁶ Zellen] ± SD	LHRH-Immunreaktivität [fmol / 10 ⁶ Zellen] ± SD
EFO-21	601 ± 75	458 ± 57
EFO-27	543 ± 109	414 ± 83
NIH: Ovar-3	351 ± 81	268 ± 62
BG-1	203 ± 42	155 ± 32
SK-OV-3	387 ± 102	295 ± 78
SW 626	274 ± 32	209 ± 24
Ishikawa	532 ± 209	406 ± 159
HEC-1A	403 ± 92	307 ± 70
HEC-1B	291 ± 104	222 ± 79
KLE	487 ± 36	371 ± 27
AN-3-CA	356 ± 154	272 ± 117
MFE 296	212 ± 96	162 ± 73
MCF-7	517 ± 135	394 ± 103
NRK	-	-

Insgesamt wurde damit in allen untersuchten Ovarialkarzinomzelllinien und Endometriumkarzinomzelllinien sowie in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 die Existenz einer Substanz demonstriert, die im RIA spezifisch durch den gegen LHRH gerichteten Antikörper K-29 erkannt wird. Die Spezifität dieses Nachweises wurde durch die Untersuchung der Fibroplastenzelllinie NRK als Negativkontrolle überprüft. In den entsprechenden Zellextrakten konnte dabei keine LHRH-Immunreaktivität detektiert werden.

3.3.2. Nachweis von LHRH-Immunreaktivität in resezierten Tumorgeweben

Die Experimente zum Nachweis von LHRH-Immunreaktivität wurden nach der erfolgreichen Untersuchung der Zelllinien auf primäres Tumormaterial ausgedehnt. Die Gewebe wurden in der Frauenklinik der Philipps-Universität entnommen und sind mit ihren Charakteristiken unter 2.5. zusammengefaßt.

Tab. III-4: Nachweis von LHRH-Immunreaktivität in primärem Tumormaterial (zur Histologie: vgl. 2.5.).

Probe Nr.	LHRH-Immunreakt. [pg/mg Protein] \pm SD	Probe Nr.	LHRH-Immunreakt. [pg/mg Protein] \pm SD	Probe Nr.	LHRH-Immunreakt. [pg/mg Protein] \pm SD
1	18,8 \pm 7,2	15	9,3 \pm 11,1	29	2,7 \pm 0,2
2	8,2 \pm 3,4	16	30,4 \pm 17,2	30	6,7 \pm 1,4
3	11,8 \pm 1,9	17	1,9 \pm 0,9	31	17,2 \pm 4,9
4	10,2 \pm 2,5	18	17,3 \pm 4,1	32	4,5 \pm 6,3
5	5,1 \pm 0,4	19	9,1 \pm 4,1	33	3,5 \pm 0,1
6	3,0 \pm 1,6	20	16,0 \pm 1,2	34	21,4 \pm 19,1
7	4,0 \pm 0,7	21	26,1 \pm 3,7	35	29,8 \pm 17,2
8	17,3 \pm 3,2	22	29,6 \pm 14,8	36	32,1 \pm 12,9
9	10,0 \pm 9,9	23	6,3 \pm 4,8	37	9,5 \pm 1,2
10	5,7 \pm 3,2	24	41,8 \pm 12,4	38	16,4 \pm 5,7
11	12,9 \pm 4,1	25	38,8 \pm 16,9	39	25,8 \pm 25,8
12	5,3 \pm 1,1	26	24,3 \pm 5,1	40	9,0 \pm 1,6
13	23,6 \pm 8,4	27	12,1 \pm 8,7		
14	11,6 \pm 3,4	28	4,2 \pm 6,1	41	-

Insgesamt wurden 32 Proben von Ovarialkarzinomen (Nr. 1-32) und 8 Proben von Endometriumkarzinomen (Nr. 33-40) untersucht und bei allen eine LHRH-Immunreaktivität nachgewiesen (vgl. Tab. III-4).

Bei dem Vergleich der Meßwerte mit dem entsprechenden Grading und Staging der Ovarialkarzinomproben wird deutlich, daß keine Rückschlüsse auf eine Relation zwischen der Differenzierung des Karzinoms und der LHRH-Sekretion durch die Tumorzellen gezogen werden können. Neben der Tatsache, daß die Daten sich ausschließlich auf Tumoren im fortgeschrittenen Stadium beziehen und außerdem eine breite Streuung aufweisen ist die geringe Größe der Stichprobe für das Nichtzustandekommen einer Relation verantwortlich. Geht man davon aus, daß die Sensitivität des RIAs bei 2 pg LHRH/mg Protein liegt so lies sich bei insgesamt 100 % (32 von 32) der untersuchten Ovarialkarzinomgewebe die Synthese

von LHRH oder eines ähnlichen Peptids nachweisen. Als Negativkontrolle wurde ein Leiomyom (41) untersucht, bei dem keine LHRH-Immunreaktivität innerhalb der RIA-Nachweisgrenze demonstriert werden konnte. Die Meßwerte bezüglich der 8 Endometriumkarzinome (Nr. 33-40) bewegten sich in der gleichen Größenordnung wie die Daten der Ovarialkarzinome. Auch hier zeigten alle Endometriumkarzinome (100 %) eine LHRH-Immunreaktivität.

3.4. Bestimmung von LHRH-Bindungsstellen in Zellkulturextrakten und Tumorgewebeproben durch einen LHRH-Radiorezeptorassay

In der Literatur wurde bereits beschrieben, daß sich in den Plasmamembranen verschiedener Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien spezifische Bindungsstellen für LHRH und seine Analoga nachweisen lassen (zur Übersicht: Emons et al. 1997). Jede dieser Zelllinien exprimiert je eine Bindungsstelle mit hoher Affinität und niedriger Kapazität und eine niedrigaffine Bindungsstelle mit hoher Kapazität. Durch den spezifischen Radiorezeptor-Bindungsassay wurden die im Labor etablierten Zelllinien (vgl. Tab. II-1) und die Tumormproben (vgl. 2.5.) auf die Expression einer oder mehrerer für LHRH spezifischen Bindungsstellen untersucht. Als Radioligand wurde das mit ^{125}I markierte Triptorelin ([D-Trp⁶]LHRH eingesetzt (vgl. 2.3.3.).

Die spezifische Aktivität des markierten Peptids wurde in einer Verdrängungsreaktion von markiertem und unmarkiertem Liganden an den spezifischen Rezeptoren der Zelllinie $\alpha\text{T3-1}$ (Hypophysentumor einer transgenen Maus) bestimmt und betrug je nach Markierung zwischen 900 und 2100 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$. Durch den Einsatz eines Überschusses an Plasmaprotein-Zellmembranen konnte die maximale Bindungsfähigkeit des Radioliganden definiert werden; sie lag je nach Markierung zwischen 25 und 35 %. Die mathematischen Auswertung der Meßdaten erfolgte durch eine 2-Bindungsstellen-Scatchard-Analyse mit dem LIGAND-Computerprogramm.

3.4.1. Bestimmung von LHRH-Bindungsstellen in Plasmamembranproteinfraktionen aus Zellkulturen

Im Rahmen der Einarbeitung in die Thematik und die Etablierung des Radiorezeptorassays wurde zunächst versucht, die Ergebnisse von Emons et al. (1993b und 1993c) bezüglich der LHRH-Bindungsstellen in den Ovarialkarzinomzelllinien EFO-21 und EFO-27 sowie den

Endometriumkarzinomzelllinien Ishikawa und HEC-1A zu reproduzieren. Im Anschluß daran wurden alle in unserem Labor etablierten Zelllinien (vgl. Tab. II-1) auf die Expression von LHRH-Bindungsstellen untersucht, was die in Tab. III-5 aufgeführten Daten lieferte. Exemplarisch für die Zelllinie EFO-21 ist in der Abbildung Abb. III-4 eine Auswertung mit Hilfe der 2-Bindungsstellen-Scatchard-Plot-Analyse dargestellt. Für jeden einzelnen Radiorezeptorassay wurde ein solcher Scatchard-Plot erstellt, bei dem die Quotienten aus gebundener und freier Aktivität gegen die Steroidkonzentration aufgetragen wurden. Durch die einzelnen Punkte wurde eine Ausgleichsgerade gelegt, deren Steigung der Affinitätskonstante der Bindung entsprach. Der reziproke Wert der Steigung lieferte die Dissoziationskonstante (K_d) der Bindung. Der Schnittpunkt mit der x-Achse entsprach der Konzentration an maximal gebundenen Steroid (B_{max}), der auf die entsprechende Konzentration pro Zellzahl umgerechnet werden mußte.

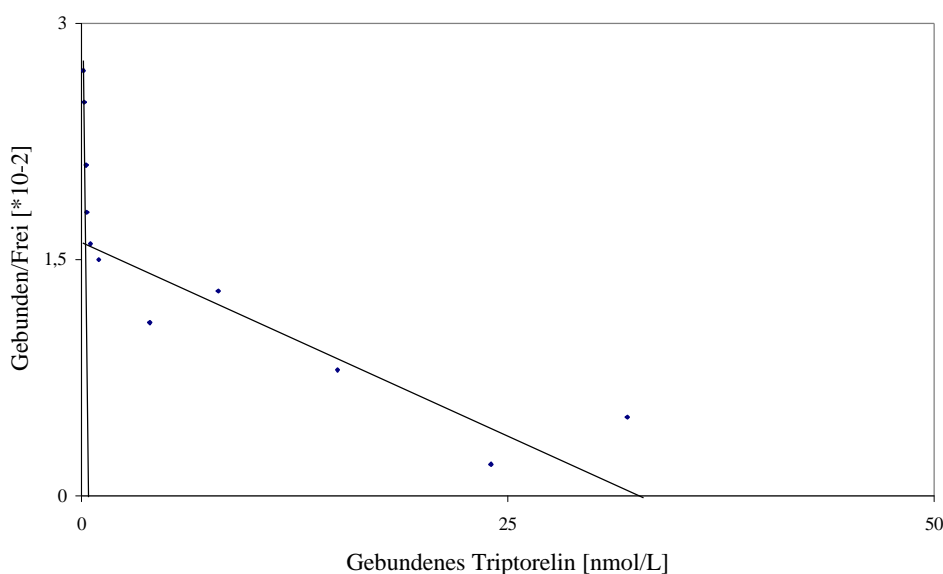


Abb. III-4: Scatchard-Plot-Analyse (2-Bindungsstellen-Analyse) der Verdrängungsreaktion von [^{125}I , D-Trp 6]LHRH durch ansteigende Konzentrationen von unmarkiertem [D-Trp 6]LHRH (10^{-13} - 10^{-4} mol/L) an Plasmaproteinfractionen der Ovarialkarzinomzelllinie EFO-21 berechnet mit dem LIGAND-Programm. Die einzelnen Punkte sind als Mittelwert einer Dreifachbestimmung angegeben.

Tab. III-5: Ergebnisse der 2-Bindungsstellen-Scatchard-Analysen aus den Meßdaten des Radiorezeptorassays mit Plasmamembranpräparationen der verschiedenen Zelllinien (K_d , Dissoziationskonstante; B_{\max} , Maximale Bindungsstellenanzahl (Rezeptorkonzentration); -, keine Bindungsstelle vorhanden).

Zelllinie		LHRH-Bindungsstellen			
		K_{d1} [*10 ⁻⁹ mol/L]	$B_{\max1}$ [fmol/10 ⁶ Zellen]	K_{d2} [*10 ⁻⁶ mol/L]	$B_{\max2}$ [pmol/10 ⁶ Zellen]
EFO-21	Ovarial- karzinomzelllinien	7,0 ± 2,7	25 ± 13	5,7 ± 1,1	69 ± 21
EFO-27		2,9 ± 2,2	23 ± 17	8,7 ± 4,5	27 ± 24
NIH: Ovarcar-3		2,3 ± 0,8	49 ± 10	2,4 ± 0,8	73 ± 18
BG-1		4,0 ± 3,7	31 ± 19	2,1 ± 1,1	16 ± 4
SK-OV-3		-	-	-	-
SW 626		-	-	-	-
Ishikawa	Endometrium- karzinomzelllinien	2,5 ± 1,6	41 ± 16	5,7 ± 0,1	12 ± 9
HEC-1A		4,0 ± 1,7	54 ± 21	5,0 ± 0,5	34 ± 6
HEC-1B		1,5 ± 0,1	72 ± 12	3,1 ± 2,9	42 ± 24
KLE		5,3 ± 5,0	16 ± 15	12,3 ± 5,5	96 ± 63
AN-3-CA		8,2 ± 0,4	62 ± 16	1,7 ± 0,5	13 ± 4
MFE 296		-	-	-	-
MCF-7		3,4 ± 2,6	84 ± 41	6,2 ± 2,4	34 ± 12
NRK		-	-	-	-

Zusammenfassend konnten so bei 4 von 6 (66,7 %) Ovarialkarzinomzelllinien und 5 von 6 (83,3 %) Endometriumkarzinomzelllinien Bindungsstellen mit hoher Affinität und niedriger Kapazität und niedrigaffine Bindungsstellen mit hoher Kapazität für LHRH nachgewiesen werden. Bei den Ovarialkarzinomzelllinien SK-OV-3 und SW 626 sowie der Endometriumkarzinomzelllinie MFE-296 konnten keine Bindungsstellen detektiert werden.

3.4.2. Bestimmung von LHRH-Bindungsstellen in resezierten Tumorgeweben

In der gleichen Art und Weise wurden auch die LHRH-Bindungsstellen mit den zugehörigen Dissoziationskonstanten für die resezierten Tumorgewebeproben bestimmt. Allerdings mußten die Daten jeweils auf die vorher bestimmte Menge Gesamtprotein (vgl. 2.3.2.) bezogen werden, um einen Vergleich untereinander möglich zu machen. In der folgenden Tabelle Tab. III-6 sind nur die Dissoziationskonstanten und die maximale Bindung für die vorhandenen hochaffinen Bindungsstellen wiedergegeben.

Tab. III-6: Ergebnisse der 2-Bindungsstellen-Scatchard-Analysen aus den Meßdaten des Radiorezeptorassays mit Plasmamembranpräparationen der verschiedenen Tumorgewebeproben (K_{d1} , Dissoziationskonstante; B_{max} , Maximale Bindungsstellenanzahl (Rezeptorkonzentration); -, keine Bindungsstelle vorhanden).

Probe Nr.	K_{d1} [*10 ⁻⁹ mol/L]	B_{max} [fmol/mg Protein]	Probe Nr.	K_{d1} [*10 ⁻⁹ mol/L]	B_{max} [fmol/mg Protein]
1	11	649	21	-	-
2	1,6	98	22	1,7	138
3	90	480	23	3,3	83
4	61	913	24	0,4	17
5	6,4	107	25	-	-
6	-	-	26	-	-
7	1,3	12	27	0,4	100
8	0,6	79	28	0,3	17
9	2,8	170	29	6,6	52
10	0,2	6	30	0,1	6,5
11	-	-	31	9,3	368
12	1,3	30	32	7	103
13	0,7	23	33	3,6	369
14	-	-	34	6,7	136
15	0,8	79	35	-	-
16	0,6	30	36	4,5	102
17	-	-	37	86	236
18	2,3	85	38	0,4	139
19	0,1	3,5	39	-	-
20	3,3	184	40	0,07	39

Die zusammenfassende Auswertung ergab, daß 78 % (25 von 32) der hier untersuchten resezierten Ovarialkarzinome (Proben-Nr. 1-32) hochaffine LHRH-Bindungsstellen exprimieren. Bei den Endometriumkarzinomen (Proben-Nr. 33-40) weisen 75 % (6 von 8) der untersuchten Tumorproben hochaffine Bindungsstellen auf. Als Negativkontrolle fungierte ein Leiomyom, bei dem keine Bindungsstellen für LHRH demonstriert werden konnte.

Insgesamt aber können auch hier keine direkten Rückschlüsse aus dem Vergleich der Meßwerte mit dem entsprechenden Grading und Staging der Tumorproben (vgl. Tab. II-5) beziehungsweise eine Relation zwischen der Differenzierung des Karzinoms und der Expression von hochaffinen Bindungsstellen in den Karzinomzellen gezogen werden.

3.5. Molekularbiologische Ansätze

Im Anschluß an den Nachweis der Expression einer LHRH-immunreaktiven Substanz und der spezifischen hochaffinen LHRH-Bindungsstellen auf der Proteinebene in Zelllinien und Tumorgewebeproben, sollte im Folgenden durch molekularbiologische Untersuchungen gezeigt werden, daß in dem jeweiligen biologischen Material auch die mRNA-Transkripte für die Expression von LHRH beziehungsweise LHRH-Rezeptoren aktiviert waren. Diese Experimente dienten zur Klärung der Identität der nachgewiesenen immunreaktiven und biologisch wirksamen Substanz der Bindungsstellen und zielten auf die Demonstration von mRNA mit den Basensequenzen des humanen LHRH und des hypophysären LHRH-Rezeptors.

3.5.1. Anwendung der Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) zum Nachweis spezifischer mRNA-Sequenzen

Die Methode der Wahl, spezifische DNA-Spezies zu detektieren, war die Polymerase Kettenreaktion (PCR, vgl. 2.4.2.2.). Um RNA-Spezies nachzuweisen, war eine vorgeschaltete cDNA-Synthese notwendig, bei der mittels des Enzyms Reverse Transkriptase die RNA-Proben in DNA – sogenannte first strand cDNA – umgeschrieben wurden. Aus den RNA-Proben wurde hierbei unter definierten Bedingungen (eingesetzt: 4 µg RNA / 7,6 µl) die komplementäre cDNA synthetisiert (vgl. 2.4.2.1.). Durch die Verwendung von Primern (vgl. 2.4.2.3), die mit einer definierten Region der gesuchten Sequenz hybridisieren, wurde versucht, die mRNA für humanes LHRH und für den humanen LHRH-Rezeptor in Tumorzelllinien und in dem primären Tumormaterial nachzuweisen. Die Strategie der Amplifikation spezieller Nukleinsäuresequenzen ist in Abbildung Abb. III-5 schematisch dargestellt. Durch sequentielle DNA-Synthese mittels des thermostabilen Enzyms Taq-Polymerase konnte in Anwesenheit der spezifischen Primer die gesuchte Sequenz in aufeinanderfolgenden Zyklen von Denaturierung, Annealing und Synthese exponentiell vermehrt werden (vgl. 2.4.2.2.).

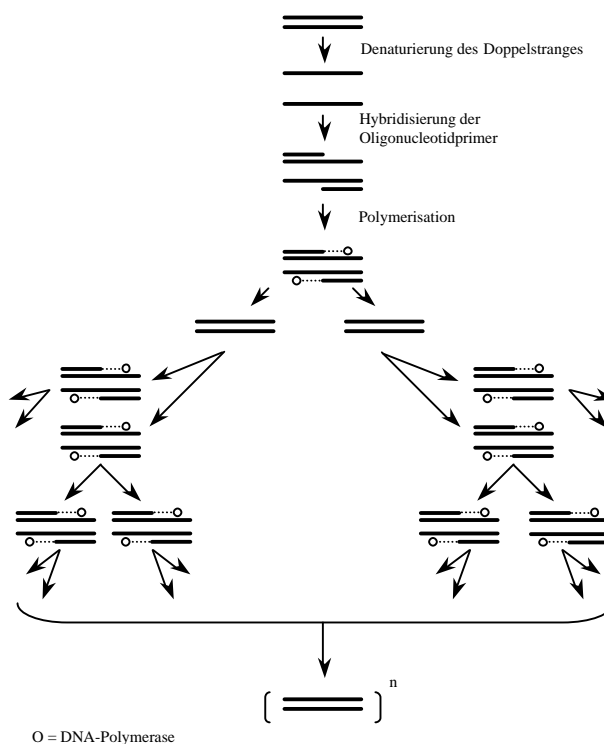


Abb. III-5: Schematische Darstellung der Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

3.5.1.1. Kontrolle der RT-PCR durch Nachweis der Expression von mRNA für GAPDH

Nach der Synthese der first strand cDNA wurden die Proben (Zelllinien und Tumormaterial) daraufhin mit dem Oligonukleotidprimerpaar Nr. 5 für einen Bereich der DNA-Sequenz eines Enzyms der Glykolyse, dem Glutaraldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH), in der PCR kontrolliert. Da die Expression von GAPDH in allen tierischen und humanen Zellen erfolgt, wurden die Nachweise dieses Haushaltsgenes allgemein als Kontrolle für die Qualität der cDNA verwendet.

Dabei fanden sich amplifizierte DNA-Fragmente mit einer Größe von 356 bp (Abb. III-6). Die Analyse der durch PCR amplifizierten DNA erfolgte nach der PCR durch die Auftrennung je eines Aliquots (1/5 des PCR-Ansatzes = 10 µl) auf einem Agarosegel (2.4.3.) mit Ethidiumbromidfärbung. Wie in der Abbildung Abb. III-6 exemplarisch dargestellt hatten die amplifizierten Produkte jeweils die erwartete Größe (356 bp), was bedeutete, daß die Synthese der first strand cDNA aus den RNA-Präparationen erfolgreich war. Kontrolliert auf die Expression von GAPDH wurden so jeweils alle RNA-Präparationen aus den Zelllinien und

den Tumorgewebe. In den folgenden Experimenten zum Nachweis der mRNA für LHRH und dessen Rezeptor wurden ausschließlich positiv reagierende Proben eingesetzt. Einzige Ausnahme aufgrund der Speziespezifität der eingesetzten Primer waren die RNA-Präparationen aus der Rattenfibroblastenzelllinie NRK.

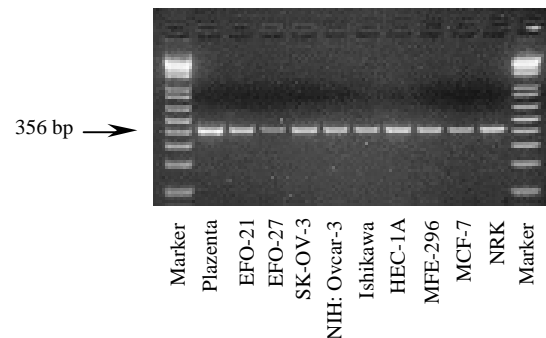


Abb. III-6: Elektrophoretische Auftrennung von cDNA-Proben nach PCR (35 Zyklen) mit Oligonukleotidprimern (Nr. 5) für humanes GAPDH nach 2.4.2. (2 %iges Agarosegel mit Ethidiumbromidfärbung; Auftragsvolumen: 1/5 des PCR-Ansatzes (10µl)).

3.5.1.2. Nachweis der mRNA-Expression für LHRH in Zelllinien und Tumorgewebe durch RT-PCR, Southern Blot und Restriktionsanalyse

Aus der Sequenz des humanen LHRH-Gens, das durch ein einziges Gen kodiert wird, wurden zwei verschiedene Primerkombinationen (vgl. 2.4.2.3.) derart ausgewählt, um verschiedene Regionen der LHRH-Sequenz spezifisch amplifizieren zu können.

Das Primerpaar Nr. 3 umschließt ein DNA-Fragment von 421 bp Größe und befindet sich auf einem nicht translatierten 5'-Überhang (Lokalisation vgl. 2.4.2.3.). Das Primerpaar Nr. 4 umschließt ein 574 bp – Fragment, in das die Sequenz für LHRH einschließlich einer vorausgehenden Signalsequenz und des nachfolgenden GAP (GnRH-associated peptide; ein Peptid, das die hypophysäre Prolaktinsekretion hemmt) integriert ist. Da die cDNA-Sonde für diesen Sequenzbereich zur Verfügung stand (huLHRH; 2.4.5.6.), konnten die mit dem Primerpaar Nr. 4 in der PCR amplifizierten DNA-Fragmente durch Southern Blot-Hybridisierungsanalysen kontrolliert werden.

Die Abbildung Abb. III-7 zeigt exemplarisch ein Agarosegel, auf das mit dem Primerpaar Nr. 3 amplifizierte cDNA aufgetragen wurde. Dabei gelang der Nachweis der gesuchten Sequenz eindeutig bei allen Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien. Die Spezifität der

Ergebnisse wurde jeweils durch den Einbezug einer Positivkontrolle (cDNA aus Plazentagewebe) und einer Negativkontrolle (cDNA aus NRK-Fibroblastenzelllinie) überprüft.

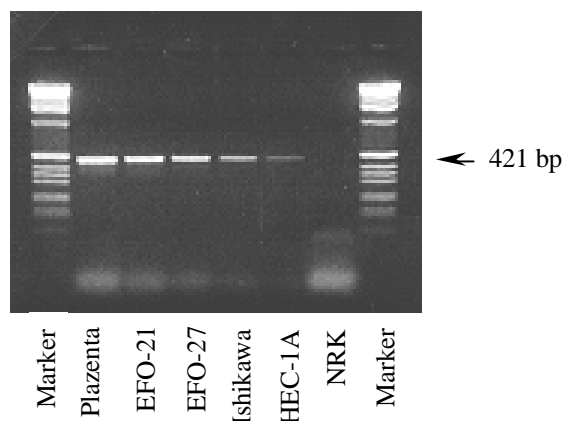


Abb. III-7: Elektrophoretische Auftrennung von cDNA-Proben, die mit dem Primerpaar Nr. 3 in der PCR amplifiziert wurden (2 %iges Agarosegel mit Ethidiumbromidfärbung; Marker, 1 Kb-DNA-Leiter; Auftragsvolumen: 1/5 des PCR-Ansatzes (10µl)).

Analoge Experimente unter Einsatz des Primerpaares Nr. 4 bestätigten den Nachweis der Aktivierung des LHRH-Gens in den Tumorzelllinien. Die Abbildung Abb. III-8 zeigt exemplarisch für verschiedene Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien zum einen die elektrophoretisch aufgetrennten, amplifizierten cDNA-Proben (Fragmentgröße 574 bp mit dem Primerpaar Nr. 4) auf einem Agarosegel mit Ethidiumbromidfärbung, zum anderen ist die Überprüfung der PCR-Fragmente nach dem Transfer der DNA auf eine Nylonmembran im Southern Blot (Southern Blot Hybridisierung mit der cDNA-Sonde huLHRH nach 2.4.5.) dargestellt.

Neben der Überprüfung der mit den Primerpaar Nr. 4 zum Nachweis von LHRH-mRNA amplifizierten cDNA durch Southern Blot-Analyse konnte durch Restriktionsanalysen demonstriert werden, daß es sich um ein Transkript mit der Basenfolge der humanen LHRH-mRNA handelt. Hierfür wurden die PCR-Produkte (574 bp) der verschiedenen cDNA-Proben mit den Restriktionsendonukleasen Taq I und Dra I behandelt. Die Inkubation der DNA-Fragmente mit den Restriktionsendonukleasen generierte jeweils die spezifischen erwarteten Bruchstücke: Taq I (352 bp und 222 bp), Dra I (447 bp und 127 bp). Exemplarisch ist das Ergebnis eines solchen Restriktionsverdaus für eine Probe der Ovarialkarzinomzelllinie NIH: Ovar-3 in der Abbildung Abb. III-9 dargestellt.

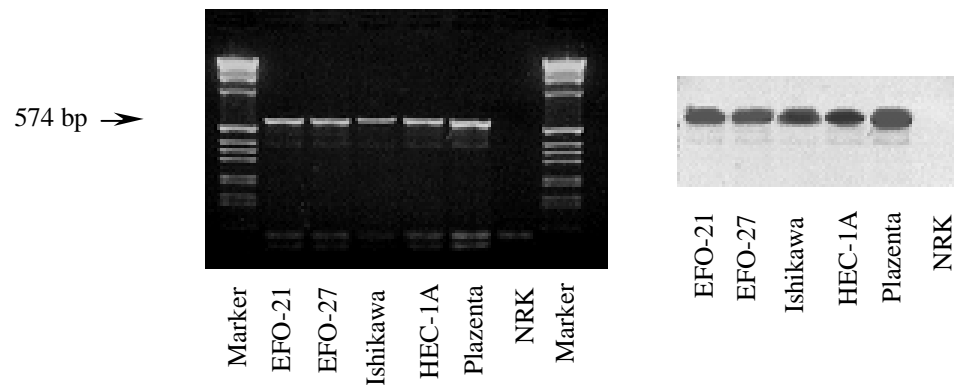


Abb. III-8: Links: Elektrophoretische Auftrennung von cDNA-Proben, die mit dem Primerpaar Nr. 4 in der PCR amplifiziert wurden (2 %iges Agarosegel mit Ethidiumbromidfärbung; Auftragsvolumen: 1/5 des PCR-Ansatzes (10µl); P, Plazenta (Positivkontrolle); N, NRK (Negativkontrolle); Marker, 1 Kb-DNA-Leiter)). Rechts: Southern Blot-Analyse des links dargestellten Agarosegels (zur Durchführung: vgl. 2.4.5.) mit der humanen cDNA-Sonde huLHRH.

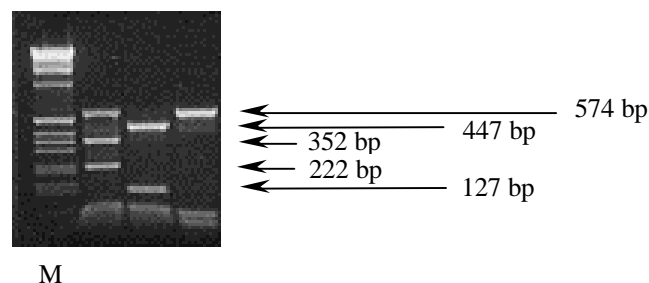


Abb. III-9: Kontrolle des 574 bp-PCR-Produktes durch Restriktionsverdau mit Taq I (352 bp und 222 bp) und Dra I (447 bp und 127 bp). Elektrophoretische Auftrennung eines DNA-Fragmentes einer RT-PCR aus NIH: Ovarcar-3-cDNA mit dem Primerpaar Nr. 4 (M, 1 Kb-DNA-Leiter; 2 %iges Agarosegel mit Ethidiumbromidfärbung).

Mit diesen drei unterschiedlichen Methoden konnte so für die verschiedenen Tumorzelllinien die Expression der mRNA für das humane LHRH nachgewiesen werden. Es zeigte sich, daß alle Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien die LHRH-mRNA-Transkripte exprimieren.

Nicht nur die elektrophoretischen Nachweise der PCR-Amplifikate und die entsprechenden Restriktionsverdauungen zeigten positive Ergebnisse, sondern auch die Bestätigungen durch die positiven Southern Blot-Hybridisierungen untermauerten die Resultate. Von den ebenfalls 32 untersuchten Gewebeproben aus Ovarialkarzinomen reagierten 30 in der RT-PCR mit den beiden Primerpaaren zum Nachweis der LHRH-mRNA positiv (93,8 %), während bei den untersuchten Endometriumkarzinomproben in 7 von 8 Fällen (87,5 %) die gesuchten mRNA-Sequenzen demonstriert werden konnte.

3.5.1.3. Nachweis der mRNA-Expression für den LHRH-Rezeptor in Zelllinien und Tumorgewebe durch RT-PCR, Southern-Blot und Restriktionsanalyse

Für den Nachweis von mRNA mit der Sequenz des humanen hypophysären LHRH-Rezeptors in RNA-Präparationen aus Tumorzelllinien und Tumorgeweben wurde neben dem etablierten Oligonukleotidprimerpaar Nr. 1 (Kakar et al. 1992) ein neues, selbst konstruiertes Primerpaar Nr. 2 herangezogen. Dies war notwendig, weil das etablierte Primerpaar Nr. 1 ein sehr großes Amplifikationsprodukt lieferte, das sich für die Durchführung einer quantitativen RT-PCR ungeeigneter erwies als das ein kürzeres Fragment liefernde Primerpaar Nr. 2. Die etablierten Primer (Paar Nr. 1; bp 31-51 und bp 899-915, vgl. 2.4.2.3.) liegen innerhalb der kodierenden Sequenz (bp 1 bis 1560) auf dem Gen und umfassen ein Nukleinsäurefragment von 884 bp Größe. Das neu generierte Primerpaar Nr. 2 (Lokalisation: bp 367-387 und bp 761-777, vgl. 2.4.2.3.) liegt ebenfalls in der kodierenden Sequenz, beinhaltet ein Intron und amplifiziert ein 417 bp-Fragment. Die in der PCR amplifizierte DNA (2.4.2.) aus den verschiedenen cDNA-Proben wurde nach dem elektrophoretischen Nachweis durch Southern Blots wie unter 2.4.5. beschrieben unter Hybridisierung mit der cDNA-Sonde für den humanen LHRH-Rezeptor (2.4.5.6.) kontrolliert. Als Positivkontrolle wurde in beiden Fällen cDNA aus der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 eingesetzt, als Negativkontrolle cDNA aus NRK-Zellen. Die Abbildungen Abb. III-10 und Abb. III-11 zeigen exemplarisch elektrophoretisch aufgetrennte, amplifizierte cDNA-Proben auf einem Agarosegel mit Ethidiumbromidfärbung und die Kontrolle der PCR-Fragmente nach dem Transfer der DNA im Southern Blot.

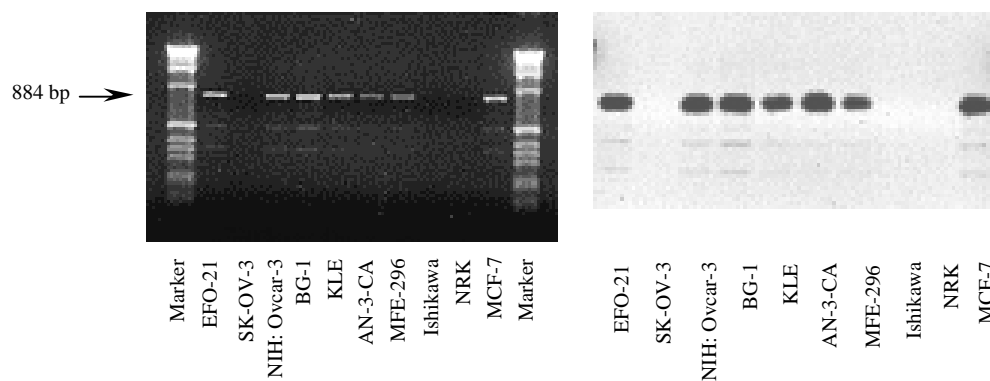


Abb. III-10: Links: Elektrophoretische Auftrennung von mit den Oligonukleotidprimern (Primerpaar Nr. 1) für den humanen LHRH-Rezeptor amplifizierter cDNA aus Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien (2 %iges Agarosegel mit Ethidiumbromidfärbung; Auftragsvolumen: 1/5 des PCR-Ansatzes (10 μ l); P, MCF-7 (Positivkontrolle); N, NRK (Negativkontrolle)).

Rechts: Southern Blot-Analyse des links dargestellten Agarosegels (zur Durchführung: vgl. 2.4.5.) mit der humanen cDNA-Sonde huLHRH-Rezeptor.

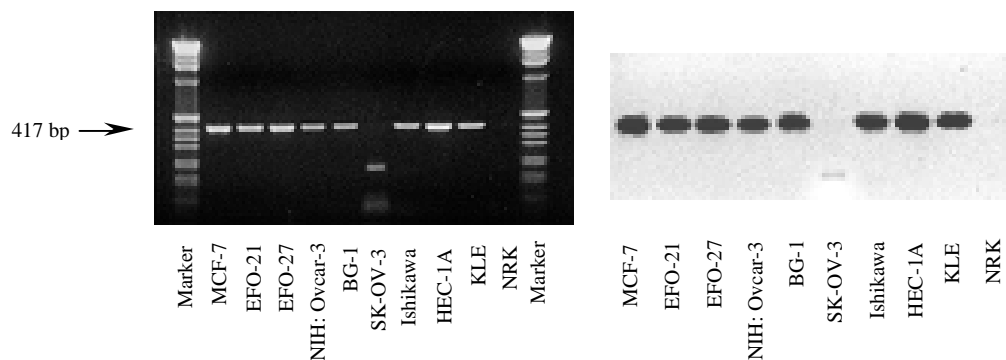


Abb. III-11: Links: Elektrophoretische Auftrennung von mit den Oligonukleotidprimern (Primerpaar Nr. 2) für den humanen LHRH-Rezeptor amplifizierter cDNA aus Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien (2 %iges Agarosegel mit Ethidiumbromidfärbung; Auftragsvolumen: 1/5 des PCR-Ansatzes (10 μ l); P, MCF-7 (Positivkontrolle); N, NRK (Negativkontrolle)).

Rechts: Southern Blot-Analyse des links dargestellten Agarosegels (zur Durchführung: vgl. 2.4.5.) mit der humanen cDNA-Sonde huLHRH-Rezeptor.

Die Überprüfung der Nukleinsäuresequenz der mit den Oligonukleotidprimern für den humanen LHRH-Rezeptor amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte neben der Southern Blot-Hybridisierung zusätzlich durch Restriktionsverdaus mit spezifischen Restriktionsendonukleasen. Für die Amplifikate der beiden Primerpaare Nr. 1 und Nr. 2 wurden die Restriktionsenzyme Pst I und Bam HI ausgewählt. Die Behandlung der 884 bp-Bande (aus Primerpaar Nr. 1) lieferten die folgenden spezifischen Spaltbruchstücke: Pst I (625 bp und 259 bp) sowie Bam HI (517 bp und 367 bp). Das Ergebnis der Behandlung einer 884 bp DNA-Bande ist in der Abbildung Abb. III-12 exemplarisch für die amplifizierte cDNA-Probe der Ovarialkarzinomzelllinie NIH: Ovarcar-3 dargestellt. Die Existenz der spezifischen Schnittstellen in dem PCR-Konstrukt bestätigt, daß es sich um DNA mit der Sequenz des humanen LHRH-Rezeptors handelt.

Bei dem Restriktionsverdaus der 417 bp-Bande aus der Amplifikation mit dem Primerpaar Nr. 2 gingen ebenfalls die vorhergesehenen Spaltprodukte hervor: Pst I (114 bp und 297 bp) sowie Bam HI (179 bp und 232 bp). Die Abbildung Abb. III-13 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der Restriktionsverdaus von mit dem Primerpaar Nr. 2 amplifizierten cDNA-Proben der Ovarialkarzinomzelllinie EFO-21 und der Endometriumkarzinomzelllinie Ishikawa mit den Restriktionsendonukleasen Pst I und Bam HI.

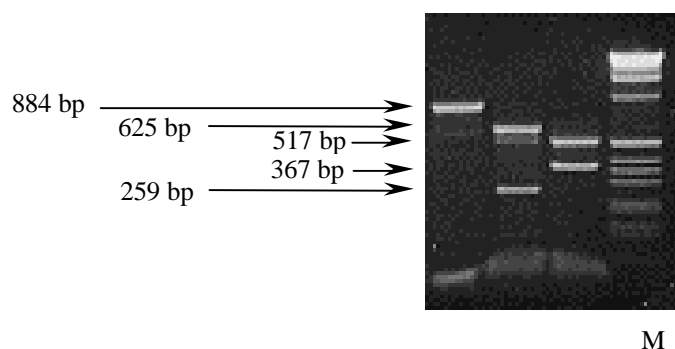


Abb. III-12: Kontrolle des 884 bp-PCR-Produktes (mit dem Primerpaar Nr. 1 amplifiziert) durch Restriktionsverdaus. Elektrophoretische Auftrennung eines DNA-Fragmentes einer RT-PCR aus NIH: Ovarcar-3-cDNA, die mit den Restriktionsenzymen Pst I (625 bp und 295 bp) und Bam HI (517 bp und 367 bp) verdaut wurde (M, 1 Kb-DNA-Leiter; 2 %iges Agarosegel mit Ethidiumbromidfärbung).

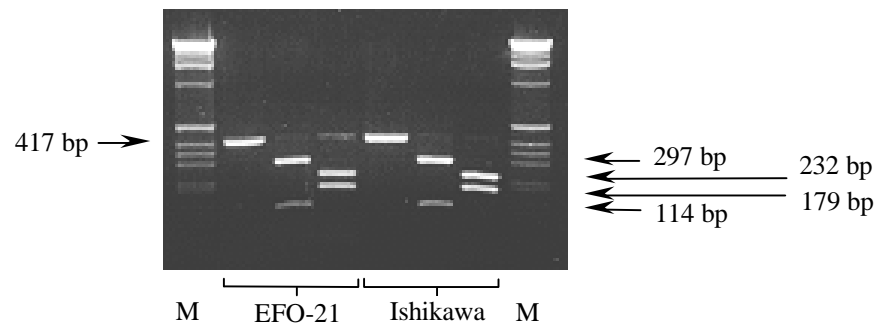


Abb. III-13: Kontrolle des 417 bp-PCR-Produktes (mit dem Primerpaar Nr. 2 amplifiziert) durch Restriktionsverdau. Elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente einer RT-PCR aus EFO-21- und Ishikawa-cDNA, die mit den Restriktionsenzymen Pst I (297 bp und 114 bp) und Bam HI (232 bp und 179 bp) verdaut wurden (M, 1 Kb-DNA-Leiter²; %iges Agarosegel mit Ethidiumbromidfärbung).

Durch die oben gezeigten Experimente konnte eindeutig die Existenz der mRNA für den LHRH-Rezeptor in den Ovarialkarzinomzelllinien EFO-21, EFO-27, NIH: Ovarcar-3, BG-1 und in den Endometriumkarzinomzelllinien Ishikawa, HEC-1A, HEC-1B, KLE, AN-3-CA und MFE 296 sowie in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 demonstriert werden. Die einzigen Ausnahmen weisen bei den Ergebnissen die Endometriumzelllinien Ishikawa und HEC-1A auf, die mit dem Primerpaar Nr. 2 eindeutig ein LHRH-Rezeptor-Transkript amplifizieren, hingegen mit dem etablierten Primerpaar Nr. 1 keine Amplifikate detektierten (Tab. III-7). Einzig die Ovarialkarzinomzelllinien SK-OV-3 und SW 626 zeigen weder in der RT-PCR bei beiden Primerpaaren, noch in der Southern Blot-Hybridisierung ein positives Ergebnis und exprimierten nicht die mRNA für den humanen hypophysären LHRH-Rezeptor. In der Tabelle Tab. III-7 sind die Ergebnisse aller untersuchten Zelllinien und der Tumorproben im Bezug auf die LHRH-Rezeptor-mRNA Expression zusammengestellt.

Insgesamt exprimieren 4 von 6 (66,7 %) Ovarialkarzinomzelllinien und 6 von 6 Endometriumkarzinomzelllinien die mRNA für den hypophysären LHRH-Rezeptor. Bei den untersuchten Tumorproben von Ovarialkarzinomen konnte in 78 % (25 von 32) der Fälle DNA mit der Basenfolge des Gens für den humanen LHRH-Rezeptors amplifiziert werden. Von den 8 untersuchten Endometriumkarzinom-Proben reagierten 6 positiv (75 %). Für das

als Negativkontrolle bei den Primärtumoren fungierenden Leiomyom konnte mit beiden Primerpaaren keine LHRH-mRNA-Expression demonstriert werden. Die positiven beziehungsweise negativen Ergebnisse der PCR-Analysen wurden dabei jeweils durch Southern Blot-Analysen und Restriktionsanalysen mit den bestätigt.

Tab. III-7: Zusammenstellung der Ergebnisse der Amplifikation von cDNA-Proben aus Zelllinien und Tumorgewebe in der PCR mit den Oligonukleotidprimerpaaren Nr. 1 und Nr. 2 zum Nachweis von LHRH-Rezeptor-mRNA (+, positiv getestet; -, negativ getestet).

Material	cDNA-Probe	Primerpaar		Material	cDNA-Probe	Primerpaar	
		Nr. 1	Nr. 2			Nr. 1	Nr. 2
Ovarialkarzinom- zelllinien	EFO-21	+	+	Ovarialkarzinome	14	-	-
	EFO-27	+	+		15	+	+
	NIH: Ovcara-3	+	+		16	+	+
	BG-1	+	+		17	-	-
	SK-OV-3	-	-		18	+	+
	SW 626	-	-		19	+	+
Endometriumkar- zinomzelllinien	Ishikawa	-	+		20	+	+
	HEC-1A	-	+		21	-	-
	HEC-1B	+	+		22	+	+
	KLE	+	+		23	+	+
	AN-3-CA	+	+		24	+	+
	MFE 296	+	+		25	-	-
Kontrollen	MCF-7	+	+		26	-	-
	NRK	-	-		27	+	+
Ovarialkarzinome	1	+	+		28	+	+
	2	+	+		29	+	+
	3	+	+		30	+	+
	4	+	+		31	+	+
	5	+	+		32	+	+
	6	-	-	Endometriumkarzinome	33	+	+
	7	+	+		34	+	+
	8	+	+		35	-	-
	9	+	+		36	+	+
	10	+	+		37	+	+
	11	-	-		38	+	+
	12	+	+		39	-	-
	13	+	+		40	+	+

3.6. Untersuchung der Rezeptor-Regulation auf Gen- und Proteinebene durch Triptorelin und Cetrorelix in Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien

Die Untersuchungen zur Regulation der LHRH-Rezeptordichte in Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien sollten zeigen, daß sowohl durch den LHRH-Agonisten Triptorelin als auch durch den LHRH-Antagonisten Cetrorelix (jeweils 10^{-5} mol/L) im Sinne einer auf LHRH basierenden autokrinen Regulation die spezifischen LHRH Bindungsstellen auf der Proteinebene in Form des membranständigen Rezeptors und auf Genebene in Form der mRNA reguliert werden. Als Modellsystem-Zelllinien wurden die beiden Ovarialkarzinomzelllinien EFO-21 und EFO-27 sowie die zwei Endometriumkarzinomzelllinien Ishikawa und HEC-1A verwendet, die sowohl einen positiven LHRH-Rezeptor mRNA Befund (vgl. 3.5.1.3.) als auch die entsprechenden LHRH-Bindungsstellen (vgl. 3.4.1.) aufwiesen.

3.6.1. Nachweis der Regulation der mRNA-Expression für den LHRH-Rezeptor durch quantitative RT-PCR

Zum Nachweis der Regulation der LHRH-Rezeptor mRNA-Expression wurde eine kompetitive RT-PCR basierend auf dem Primerpaar Nr. 2 und dem synthetisierten internen Standard entwickelt (vgl. 1.4.6.). Das Primerpaar Nr. 2 amplifiziert in der PCR gleichermaßen den in konstanter Menge zugesetzten internen Standard und die cDNA des humanen LHRH-Rezeptors. Um eine Quantifizierung möglich zu machen wurde in der PCR das radioaktive Nukleotid α - 32 P-dATP (Fa. Hartmann) zugesetzt, die einzelnen Banden ausgeschnitten und im Beckman-Counter (Beckman LS 1801) die entsprechende Radioaktivität gemessen.

Standardisiert ist die quantitative kompetitive RT-PCR auf die in der cDNA-Synthese eingesetzte Menge an Gesamt-RNA (immer 4 μ g / 7,6 μ l), die vorher photometrisch im GeneQuant II (vgl. 2.4.1.2.) bestimmt und entsprechend verdünnt wurde.

Zur Auswertung wurden die Intensitäten des amplifizierten internen Standards nach der Messung gleich 100 % gesetzt und so die entsprechenden Mengen an amplifizierter LHRH-Rezeptor-cDNA auf diesen Wert relativiert. Für die entsprechenden Zeitpunkte 24, 48, 72 und 96 h nach Inkubation mit den LHRH-Analoga ergaben sich somit immer im Vergleich zu der jeweiligen unbehandelten Kontrolle die prozentualen Abnahmen der LHRH-Rezeptor-mRNA Expression.

3.6.1.1. Nachweis der Regulation der mRNA-Expression für den LHRH-Rezeptor durch Inkubation mit dem LHRH-Agonisten Triptorelin in Tumorzelllinien

Für die Ovarialkarzinomzelllinien EFO-21 und EFO-27 und die Endometriumkarzinomzelllinien Ishikawa und HEC-1A konnte nach 96 h Inkubation mit dem LHRH-Agonisten Triptorelin eine signifikante Reduktion der mRNA für den LHRH-Rezeptor zwischen 75 und 85 % detektiert werden. Dabei wurde deutlich, daß die Inkubation mit Triptorelin die LHRH-Rezeptor-mRNA-Expression kontinuierlich herunterreguliert (vgl. Abb. III-15). Im einzelnen sind die Daten für die verschiedenen Zelllinien in der Tabelle Tab. III-8 dargestellt. Ein typisches zur Auswertung und Intensitätsmessung herangezogenes Agarosegel mit Ethidiumbromidfärbung ist exemplarisch für die jeweils durchgeführten unabhängigen Dreifachbestimmungen an jeder Zelllinie in der Abbildung Abb. III-4 dargestellt.

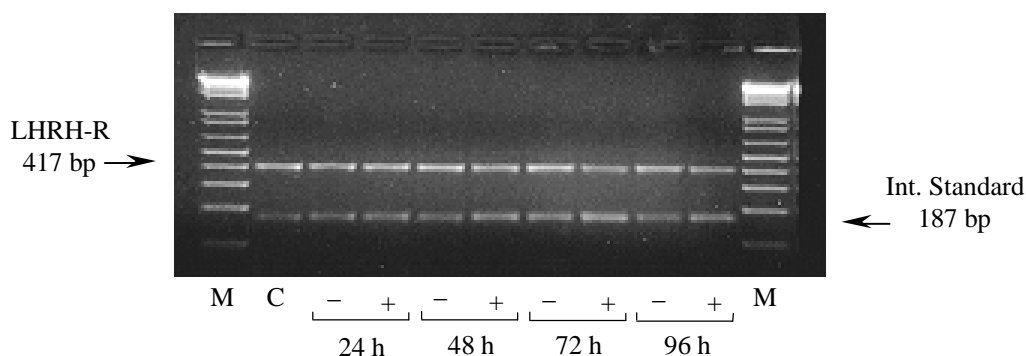


Abb. III-14: Elektrophoretische Auftrennung von mit dem Primerpaar Nr. 2 für den humanen LHRH-Rezeptor amplifizierter cDNA (417 bp) und dem internen Standard (187 bp) nach 24, 48, 72 und 96 h Behandlung mit (+) /ohne (-) Triptorelin (10^{-5} mol/L) in der Ovarialkarzinomzelllinie EFO-21. (M, 1 Kb-Plus-DNA-Leiter; C, Kontrolle; 2 %iges Agarosegel mit Ethidiumbromidfärbung).

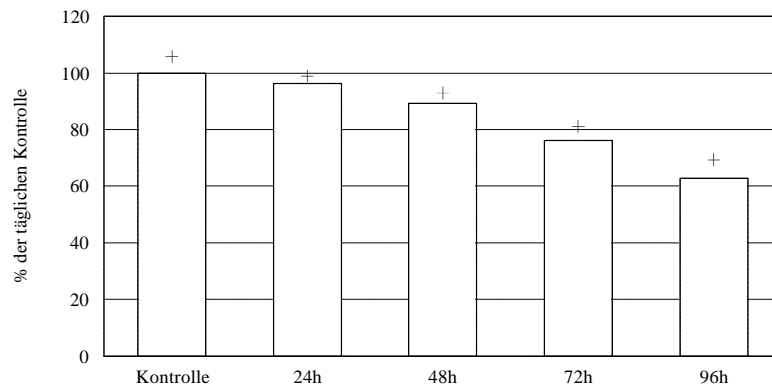


Abb. III-15: Prozentuale Darstellung der Daten aus der quantitativen RT-PCR für die Ovarialkarzinomzelllinie EFO-21 und. Abgebildet sind die prozentualen LHRH-Rezeptor-mRNA Expressionsraten in [% \pm SD] im Vergleich zur Kontrolle nach 24, 48, 72 und 96 h Behandlung mit/ohne Triptorelin (10^{-5} mol/L).

Tab. III-8: Zusammenstellung der Daten aus den quantitativen RT-PCR-Analysen zur Regulation der LHRH-Rezeptor-mRNA Expression in Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien. Angegeben sind die Expressionsraten aus jeweils 3 unabhängigen Einzelassays in [% \pm SD] der täglichen Kontrolle nach der Behandlung mit dem LHRH-Agonisten Triptorelin.

Zelllinie	Kontrolle	LHRH-Rezeptor-mRNA Expressionsraten nach Inkubation mit dem LHRH-Agonisten Triptorelin (10^{-5} mol/L)			
		24 h	48 h	72 h	96 h
EFO-21	100 \pm 5,8	96,4 \pm 2,5	89,4 \pm 3,5	76,2 \pm 4,9	62,9 \pm 6,4
EFO-27	100 \pm 6,3	95,3 \pm 3,7	90,3 \pm 4,0	75,6 \pm 4,1	60,8 \pm 5,8
Ishikawa	100 \pm 4,9	98,0 \pm 2,5	90,6 \pm 3,9	78,1 \pm 6,7	63,7 \pm 7,0
HEC-1A	100 \pm 6,5	96,5 \pm 2,9	87,5 \pm 4,6	76,6 \pm 5,8	62,5 \pm 6,7

3.6.1.2. Nachweis der Regulation der mRNA-Expression für den LHRH-Rezeptor durch Inkubation mit dem LHRH-Antagonisten Cetrorelix in Tumorzelllinien

In gleicher Art und Weise wie unter 3.6.1.1. wurde für die Ovarialkarzinomzelllinien EFO-21 und EFO-27 und die Endometriumkarzinomzelllinien Ishikawa und HEC-1A nach 96 h Inkubation mit dem LHRH-Agonisten Triptorelin eine signifikante Reduktion der mRNA für den LHRH-Rezeptor zwischen 75 und 85 % detektiert. Auch hier zeigte sich, daß die Inkubation mit Triptorelin die LHRH-mRNA-Expression kontinuierlich herunterreguliert (vgl. Abb. III-16). In der Tabelle Tab. III-9 sind die Daten für die verschiedenen Zelllinien detailliert dargestellt.

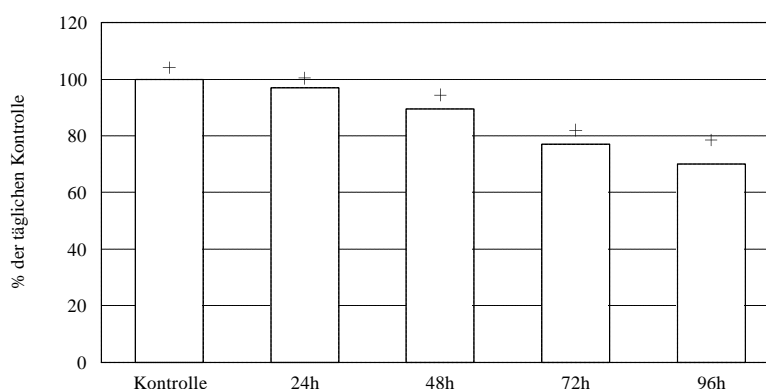


Abb. III-16: Prozentuale Darstellung der Daten aus der quantitativen RT-PCR für die Endometriumkarzinomzelllinie HEC-1A. Abgebildet sind die prozentualen LHRH-Rezeptor-mRNA Expressionsraten [% \pm SD] im Vergleich zur Kontrolle nach 24, 48, 72 und 96 h Behandlung mit/ohne Cetrorelix (10^{-5} mol/L).

Tab. III-9: Zusammenstellung der Daten aus den quantitativen RT-PCR-Analysen zur Regulation der LHRH-Rezeptor-mRNA Expression in Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien. Angegeben sind die Expressionsraten aus jeweils 3 unabhängigen Einzelassays in [% \pm SD] der täglichen Kontrolle nach der Behandlung mit dem LHRH-Agonisten Cetrorelix.

Zelllinie	Kontrolle	LHRH-Rezeptor-mRNA Expressionsraten nach Inkubation mit dem LHRH-Antagonisten Cetrorelix (10^{-5} mol/L)			
		24 h	48 h	72 h	96 h
EFO-21	100 \pm 3,6	95,4 \pm 4,2	90,3 \pm 4,6	79,6 \pm 5,9	68,3 \pm 7,3
EFO-27	100 \pm 2,9	96,1 \pm 5,0	91,1 \pm 3,7	80,9 \pm 6,8	69,8 \pm 6,4
Ishikawa	100 \pm 3,8	98,2 \pm 2,9	90,9 \pm 4,2	78,3 \pm 5,7	67,6 \pm 5,8
HEC-1A	100 \pm 4,1	97,0 \pm 3,4	89,5 \pm 4,9	77,1 \pm 4,9	70,1 \pm 8,4

3.6.2. Nachweis der Regulation der LHRH-Bindungsstellen durch einen Radiorezeptorassay

Mit dem Radiorezeptor-Bindungsassay wurde die durch LHRH-Analoga hervorgerufene Regulation der LHRH-Bindungsstellen auf Proteinebene analysiert. Wie in 3.6.1. gezeigt, induzieren die LHRH-Analoga Triptorelin und Cetrorelix eine Reduktion der mRNA-Expression für den LHRH-Rezeptor. Hier sollte jetzt gezeigt werden, daß diese Reduktion der mRNA-Transkripte auch eine Reduktion der membranständigen Rezeptorproteine zur Folge hat (vgl. 2.3.4.). Bei jeweils gleicher Menge an eingesetzter Plasmamembranproteinkonzentration (zur Durchführung vgl. 2.3.3.1.1.) wurden die spezifischen Bindungen (B_{\max}) der hochaffinen LHRH-Bindungsstellen mit und ohne Behandlung durch die LHRH-Analoga nach 96 h ermittelt. Dem eigentlichen Radiorezeptorassay (vgl. 2.3.3.2.) vorgeschaltet war ein Waschprotokoll (vgl. 2.3.4., Szöke et al. 1993), der das LHRH-Analogon aus der 96 stündigen Inkubation von den Bindungsstellen (Rezeptorproteinen) entfernte. Untersucht wurden auch hier die beiden Ovarialkarzinomzelllinien EFO-21 und EFO-27 sowie die Endometriumkarzinomzelllinien Ishikawa und HEC-1A.

3.6.2.1. Nachweis der Regulation der LHRH-Bindungsstellen durch Inkubation mit dem LHRH-Agonisten Triptorelin in Tumorzelllinien

Die Untersuchungen zeigten, daß sowohl bei den Ovarialkarzinomzelllinien EFO-21 und EFO-27 wie auch bei den Endometriumkarzinomzelllinien Ishikawa und HEC-1A durch den LHRH-Agonisten Triptorelin (10^{-5} mol/L) nach 96 h eine Reduktion der LHRH-Rezeptordichte um bis zu 20 % hervorgerufen wird. Im Einzelnen sind die jeweiligen Rezeptorexpressions-Abnahmen in der Tabelle Tab. III-10 aufgeführt. Die Affinität des Rezeptors änderte sich dabei nicht, was eine Kontrolle der einzelnen Dissoziationskonstanten ergab, die im Vergleich der zusammengehörenden Rezeptorassays nicht variierten.

Tab. III-10: Zusammenfassung der Radiorezeptorassay-Daten zur LHRH-Rezeptor-Regulation in Tumorzelllinien. Angegeben sind die spezifischen Bindungen der hochaffinen Bindungsstellen ($B_{\max 1}$) für den LHRH-Rezeptor als Mittelwert aus 3 Einzelassays \pm SD und die Reduktion in [% \pm SD] jeweils nach 96 h Inkubation mit/ohne Triptorelin (10^{-5} mol/L).

Zelllinie	$B_{\max 1}$ [fmol/ 10^6 Zellen] <u>ohne</u> Triptorelin	$B_{\max 1}$ [fmol/ 10^6 Zellen] <u>mit</u> Triptorelin	Reduktion [%]
EFO-21	28 ± 6	23 ± 5	18
EFO-27	25 ± 5	21 ± 6	15
Ishikawa	49 ± 9	40 ± 8	18
HEC-1A	62 ± 10	49 ± 9	21

3.6.2.2. Nachweis der Regulation der LHRH-Bindungsstellen durch Inkubation mit dem LHRH-Antagonisten Cetrorelix in Tumorzelllinien

Sowohl für die beiden Ovarialkarzinomzelllinien EFO-21 und EFO-27 wie auch für die Endometriumkarzinomzelllinien Ishikawa und HEC-1A konnte nach 96 h Inkubation durch den LHRH-Antagonisten Cetrorelix (10^{-5} mol/L) eine Reduktion der spezifischen hochaffinen LHRH-Bindungsstellen um bis zu 20 % demonstriert werden. Im Einzelnen sind die jeweiligen Rezeptorexpressions-Abnahmen in der Tabelle Tab. III-11 aufgeführt. Auch hier variierten die Dissoziationskonstanten nicht signifikant voneinander.

Tab. III-11: Zusammenfassung der Radiorezeptorassay-Daten zur LHRH-Rezeptor-Regulation in Tumorzelllinien. Angegeben sind die spezifischen Bindungen der hochaffinen Bindungsstellen ($B_{\max 1}$) für den LHRH-Rezeptor als Mittelwert aus 3 Einzelassays \pm SD und die Reduktion in [% \pm SD] jeweils nach 96 h Inkubation mit/ohne Cetrorelix (10^{-5} mol/L).

Zelllinie	$B_{\max 1}$ [fmol/ 10^6 Zellen] <u>ohne</u> Cetrorelix	$B_{\max 1}$ [fmol/ 10^6 Zellen] mit Cetrorelix	Reduktion [%]
EFO-21	28 ± 6	24 ± 5	15
EFO-27	25 ± 5	20 ± 4	21
Ishikawa	49 ± 9	41 ± 6	16
HEC-1A	62 ± 10	51 ± 7	17

3.7. Regulation der EGF-induzierten Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptors durch LHRH-Analoga in Tumorzelllinien

In diesem Punkt sollte nun die bisherigen Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Emons zur Beeinflussung der wachstumsfaktorinduzierten Tyrosinkinaseaktivität (zur Übersicht Emons et al. 1997) dahingehend erweitert werden, daß geprüft wurde, ob durch die LHRH-Analoga Triptorelin und Cetrorelix die Autophosphorylierung des EGF-Rezeptor vermindert wird. Dafür wurde die SDS-Gelelektrophorese mit anschließender Western-Blot-Technik verwendet (zur genauen Durchführung vgl. 2.4.7.). Diese Untersuchungen sollten klären, ob die LHRH-Analoga Triptorelin und Cetrorelix in Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien (EFO-21, EFO-27, Ishikawa, HEC-1A) innerhalb des Signaltransduktionsweges die EGF-induzierte Tyrosinphosphorylierung des EGF-Wachstumsfaktorrezeptors inhibieren. In einem Zellkulturansatz wurden die Zellen mit EGF (10^{-7} mol/L, 15 min) unter simultaner Behandlung mit und ohne LHRH-Analoga inkubiert und anschließend aus den Zellen Plasmamembranproteine präpariert. Die Proteine wurden mit SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese aufgetrennt und in einem Semi-Dry-Immunoblot auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Nach Absättigung der Membran wurde diese mit dem spezifischen Antikörper Anti-Phosphotyrosine (pAb), IgG (Fa. Promega) inkubiert und die Immunreaktion mit einem Peroxidase-markierten Zweitantikörper nachgewiesen. Die Detektion des Antikörpers erfolgte auf der Basis der Chemolumineszenz (ECLTM Western

blotting, Fa. Amersham). Die Methode ist detailliert bei Lee et al. 1991 beschrieben und erfolgte nach Angaben des Herstellers. Allgemein wurde für jede Zelllinie ein dreifacher Ansatz (vgl. 2.4.7.1.) geblottet und anschließend die Bandenintensitäten mit der Kodak Digital Science 1D Image Analysis Software im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle inklusive Standardabweichung bestimmt. In der Abbildung Abb. III-17 ist exemplarisch ein Western-Blot mit den entscheidenden 170 kDa-Bande für den phosphorylierten EGF-Rezeptor dargestellt.

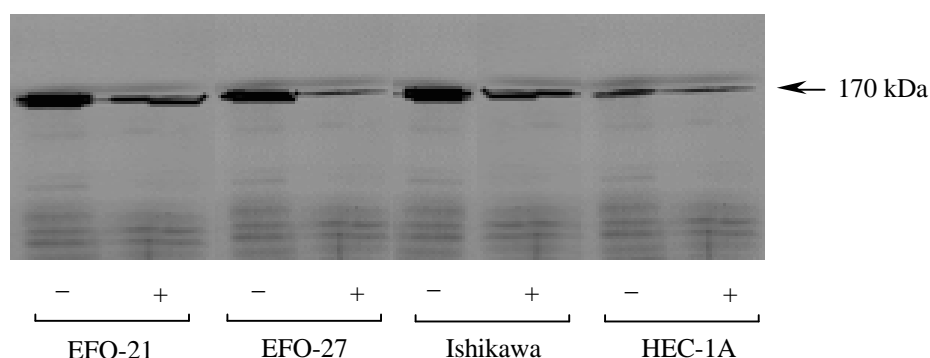


Abb. III-17: Western-Blot-Analyse mit Plasmamembranproteinpräparationen aus Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien (EFO-21, EFO-27, Ishikawa, HEC-1A) nach 15 min Inkubation mit EGF (10^{-7} mol/L) unter gleichzeitiger Inkubation mit (+)/ohne (-) Triptorelin (10^{-5} mol/L). Die 170 kDa-Bande entspricht dem phosphorylierten EGF-Rezeptor (zur genaueren Durchführung vgl. 2.4.7.).

3.7.1. Regulation der EGF-induzierten Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptors durch LHRH-Analoga

Mit der semiquantitativen Western-Blot-Analyse konnte für die Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien (EFO-21, EFO-27, Ishikawa, HEC-1A) unter dem Einfluß des LHRH-Agonisten Triptorelin eine Reduktion der EGF-induzierten Rezeptor-Tyrosinphosphorylierung um 60 – 79 % demonstriert werden. Im einzelnen sind die Auswertungen der verschiedenen Western-Blot-Analysen in der Tabelle Tab. III-12 aufgeführt.

Wie diese Tabelle im Einzelnen zeigt, erbrachte die Behandlung der Zelllinien mit dem LHRH-Antagonisten Cetrorelix ähnliche Ergebnisse wie die Behandlung mit dem LHRH-Agonisten Triptorelin. Der prinzipiell zugrunde liegende Effekt liegt also sicherlich in einer Antagonisierung der wachstumsfaktorinduzierten Tyrosinkinase, wobei die wachstumsfaktorinduzierte Tyrosinphosphorylierung unter dem Einfluß von LHRH-Analoga durch die Aktivierung einer Tyrosinphosphatase antagonisiert wird und dadurch die mitogene Signaltransduktion gleich an ihrer ersten Stelle durch Agonisten genauso wie Antagonisten erfolgreich blockiert wird. Diese Blockierung hat zur Folge, daß Agonisten und Antagonisten einen inhibitorischen antiproliferativen Effekt auf die Zelllinien ausüben. Wie in 3.2.2. dargestellt, hat der LHRH-Antagonist Cetrorelix aber keine wachstumshemmende Wirkung auf die Zelllinie EFO-27. Und trotzdem hemmt Cetrorelix auch in dieser Zelllinie die wachstumsfaktorinduzierte Rezeptorautophosphorylierung genauso wie der LHRH-Agonist Triptorelin. Die daraus resultierende Konsequenz muß demnach sein, daß der inhibitorische Effekt von Cetrorelix innerhalb der mitogenen Signaltransduktionskaskade in der Zelllinie EFO-27 weiter down-stream antagonisiert oder umgangen wird, um den in Proliferationsassays (vgl. 3.2.2.) nicht gezeigten antiproliferativen Effekt erklären zu können.

Tab. III-12: Zusammenfassung der semiquantitativen Daten der Western-Blot-Analyse zur Reduktion der EGF-induzierten EGF-Rezeptor-Tyrosinphosphorylierung in Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien unter Inkubation mit/ohne Triptorelin bzw. Cetrorelix (jeweils 10^{-5} mol/L) Angegeben sind die prozentualen Abnahmen in [% \pm SD] der Bandenintensitäten ermittelt durch die Kodak Digital Science 1D Image Analysis Software im Vergleich zur Kontrolle aus drei verschiedenen Versuchsansätzen (zur genauen Durchführung der Probenpräparation vgl. 2.4.7.)

Zelllinie	Reduktion der EGF-induzierten Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptors	
	mit Triptorelin	mit Cetrorelix
EFO-21	69 \pm 8	60 \pm 11
EFO-27	73 \pm 13	64 \pm 9
Ishikawa	68 \pm 9	79 \pm 14
HEC-1A	61 \pm 9	67 \pm 6

4. Diskussion

Klinische Beobachtungen und epidemiologische Studien und vor allem zahlreiche experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, daß Hormone, und hier insbesondere Steroidhormone, die Proliferation und Funktion von malignen Ovarial- und Endometriumkarzinomen beeinflussen können. Da auch bis heute therapeutische Maßnahmen besonders im Hinblick auf das Ovarialkarzinom unbefriedigend geblieben sind, wird der Manipulation hormonsensitiver Karzinome durch eine endokrine Therapie große Aufmerksamkeit geschenkt. Die Hoffnungen bei der Therapie mit Hormonen und Hormonanaloga beruhen zum einen auf den kurativen Effekten, die diese Substanzen zeigen, und zum anderen auf ihren positiven Gesamteinflüssen bei Patientinnen in der palliativen Therapie. Letzteres konnte zum Beispiel für Gestagengaben bei Frauen mit disseminiertem Endometriumkarzinom beobachtet werden (Schulz et al. 1991, Onnis et al. 1993). Von einer Verbesserung der Behandlungsergebnisse durch die Entwicklung einer nicht toxischen, nebenwirkungsarmen Therapie mit Steroid- oder Peptidhormonen könnten betroffene Frauen profitieren. Eine solche Hormontherapie könnte außerdem die Effektivität anderer therapeutischer Maßnahmen, wie zum Beispiel Chemo- und Radiotherapie steigern und ergänzen. Zu den physiologischen Eigenschaften des Ovars gehört, daß es zum einen als Zielorgan für Peptidhormone fungiert und zum anderen selbst Hormone – Östrogene und Progesteron – produziert. Ebenso wird auch die zyklische Proliferation des Endometriums durch Hormone, insbesondere Östrogene und Gestagene beeinflusst. Es liegt daher die Vermutung nahe, durch die Einflußnahme auf diese hormonellen Eigenschaften, beispielsweise durch eine Östrogendeprivation, auch das Wachstum endokrin regulierter Genitaltumoren beeinflussen zu können. Eine solche Östrogendeprivation wird neben der Ovariectomie durch Verabreichung von LHRH-Agonisten und LHRH-Antagonisten erreicht. Ziel einer solchen Medikation ist die sogenannte medikamentöse Kastration (vgl. 1.4.), die eine vollständige Inhibition des Ovars als endokrines Organ zur Folge hat. Neben dieser indirekten Wirkung der LHRH-Hormonanaloga zeigen eine Vielzahl von endokrinologischen Studien und klinischen Beobachtungen, daß durch die Gabe von LHRH-Analoga auch direkte Wirkungen in bestimmte Zielorganen erreicht werden können. Diese Befunde werden durch Untersuchungen unterstützt, die zeigen, daß LHRH nicht ausschließlich in den Neuronen des Hypothalamus gebildet wird, sondern ebenfalls in der Hypophyse (Pagesy et al. 1992), in der Plazenta (Tan und Rousseau 1982) und in Zellen des Immunsystems (Emanuele et al. 1990, Azad et al. 1991). Desweiteren konnte ein LHRH-ähnliches Peptid und die pepro-mRNA für

LHRH in Granulosazellen der Ratte (Clayton et al. 1992) und in der Ratten-Prostata (Azad et al. 1994) demonstriert werden. Daneben wird LHRH auch in Tumorzelllinien exprimiert. Der Nachweis gelang in Mammakarzinomzellen (Harris et al. 1991), in konditionierten Medien von Prostatakarzinomzellen (Quayum et al. 1991a), in Ovarialtumoren und Ovarialkarzinomzellen (Ohno et al. 1993, Irmer et al. 1994) und in Endometriumkarzinomzellen (Irmer et al. 1995). Während lokal sezerniertes LHRH in der Hypophyse als Neurotransmitter oder Neuromodulator fungiert, weist die Demonstration des Peptids in Lymphozyten auf eine Interaktion des neuroendokrinen Systems mit dem Immunsystem hin. In der Plazenta hingegen scheint LHRH eine reproduktive Funktion zu vermitteln. Von besonderem Interesse ist die Funktion und Bedeutung von LHRH in extrahypophysären Geweben und insbesondere in Tumoren. Da die Entstehung eines Tumors und seine Entwicklung wahrscheinlich mit multiplen genetischen Veränderungen einhergeht, ist es denkbar, daß autokrine und/oder parakrine Rückkopplungsschleifen von Peptidhormonen synergistisch mit molekularen Defekten einhergehen. Auf diesem Wege werden so eventuell Proliferationsvorteile für Tumorzellen vermittelt. Ein wichtiger Schritt in der Beurteilung der Wirkweise von Peptidhormonen ist die Signalweiterleitung über Rezeptoren und spezifische Effektoren in der humanen Zelle. Während dieser Signaltransduktionsmechanismus für LHRH in Hypophysenzellen weitgehend untersucht ist (zur Übersicht: Naor 1990, Stojilkovic und Catt 1995), liegen über die Mechanismen in Ovarial- und Endometriumkarzinomzellen auch heute nur punktuelle Erkenntnisse vor.

Der Nachweis von LHRH und LHRH-Rezeptoren in Ovarial-, Endometriumkarzinomzellen und den entsprechenden Tumoren konnte von Emons et al. (1989, 1993b, 1993c), Pahwa et al. (1989, 1991) und Irmer et al. (1994, 1995) demonstriert werden. Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Arbeit Untersuchungen zu Signaltransduktionsmechanismen, die durch LHRH-Analoga in Ovarial- und Endometriumkarzinomzellen induziert werden, vorgenommen.

In einem ersten Arbeitsschritt wurden die inhibitorischen Effekte von LHRH-Agonisten und LHRH-Antagonisten, die von Emons et al. (1993b, 1993c) gezeigt werden konnten, für die in unserem Labor etablierten Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien als Tumormodell reproduziert. Die zeit- und dosisabhängigen antiproliferativen Wirkungen des LHRH-Agonisten [D-Trp⁶]LHRH (Triptorelin) und des LHRH-Antagonisten SB-75 (Cetrorelix) konnten bestätigt werden, wobei Triptorelin und Cetrorelix in Dosen von 10 µmol/L bis 1 nmol/L signifikante inhibitorische Effekte ausübten. Außer bei der Ovarialkarzinomzelllinie

EFO-27 konnten bei allen anderen Zelllinien keine Unterschiede der inhibitorischen Effekte zwischen dem Agonisten Triptorelin und dem Antagonisten Cetrorelix gefunden werden. In EFO-27 Zellen nahm Cetrorelix selbst bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/L}$ keinen Einfluß auf die Zellproliferation, während durch Triptorelin die erwähnten zeit- und dosisabhängigen Effekte hervorgerufen wurden. Einen weiteren Hinweis auf den Wirkmechanismus der verschiedenen LHRH-Analoga konnte von Emons et al. (1993a) und Irmer et al. (1995) durch eine simultane Behandlung der Zelllinien EFO-27 mit Triptorelin und Cetrorelix geliefert werden. Dabei erfolgte die Antagonisierung der antiproliferativen Wirkung von Triptorelin eindeutig in Abhängigkeit der eingesetzten Agonisten- und Antagonistendosis. Die Interaktionen der beiden LHRH-Analoga können so offensichtlich nicht mit einfachen Verdrängungsreaktionen an den spezifischen Bindungsstellen erklärt werden. Es liegt dem ganzen ein hochkomplexer Mechanismus zugrunde, bei dem über Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion spezifische zelluläre Funktionen hervorgerufen werden. Unter der Berücksichtigung der Ergebnisse anderer Forschergruppen kann davon ausgegangen werden, daß die inhibitorische Aktivität eine direkte Wirkung der LHRH-Analoga auf die Tumorzellen darstellt. So konnte demonstriert werden, daß die Hemmung der Proliferation in einer Ovarialkarzinomzelllinie, die durch den LHRH-Agonisten Leuprorelin induziert wird, nicht auf zytotoxische Effekte des Pharmakons oder auf eine erhöhte Apoptoserate in den Kulturen zurückzuführen ist. Tatsächlich geht die Behandlung der Zellen mit einer verminderten DNA-Synthese einher, die sich in einer abnehmenden Zahl an Zellen in der Synthesephase des Zellzyklus äußert (Thompson et al. 1991). Ähnliche antiproliferative Effekte konnten auch in anderen Karzinomzelllinien nachgewiesen werden. Miller et al. (1995) berichteten, daß LHRH-Agonisten das Zellwachstum der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 supprimieren können. Sie konnten diese Wirkung ebenfalls beim Einsatz von nativen LHRH in höheren Konzentrationen erzielen. Limonta et al. (1992) beobachteten signifikante antiproliferative Effekte der LHRH-Agonisten Buserelin und Zoladex in Konzentrationen von 1 nmol/L bis zu 1 $\mu\text{mol/L}$ an Zellen der Prostatakarzinomzelllinie LNCaP. Die angeführten Untersuchungen legen die Vermutung nahe, daß die inhibitorische Aktivität von LHRH-Agonisten ein generelles Prinzip bei der Behandlung von hormonsensitiven Tumorzellen darstellt, die zudem in den Plasmamembranen spezifische LHRH-Bindungsstellen aufweisen, die diese Wirkung vermitteln können. Weitere Arbeitsgruppen haben jedoch gegensätzliche Daten vorgelegt. Eidne et al. (1987) fanden in mit LHRH-Agonisten behandelten Mammakarzinomzellen keine Inhibition der Thymidin-Inkorporation, was darauf hingewiesen hätte, daß sich die Zellen vermehrt in der Ruhephase befinden. Die Autoren

demonstrierten jedoch auch proliferationshemmende Effekte von LHRH-Antagonisten. Limonta et al. (1992) berichteten zunächst über antiproliferative Wirkungen eines LHRH-Antagonisten in hohen Konzentrationen (1 μ mol/L) auf Prostatakarzinomzellen, während in einer späteren Studie der Gruppe (Limonta et al. 1993) stimulierende Effekte dieser Substanz aufgezeigt wurden. Man versuchte, diesen Widerspruch mit unterschiedlichen Kulturbedingungen (Abwesenheit von Steroiden) zu erklären. Um solche Effekte auszuschließen, wurden die antiproliferativen Effekte von Triptorelin auf Ovarial- und Endometriumkarzinomzellen unter serum und phenolrotfreien Bedingungen nachgewiesen (Emons et al. 1994, 1995). Diese Erkenntnisse und die eigenen Untersuchungen führen zu der Erkenntnis, daß sowohl Triptorelin als auch Cetrorelix generelle antiproliferative Eigenschaften hinsichtlich ihrer Wirkungen auf Ovarial- und Endometriumkarzinomzellen in vitro vermitteln. Der LHRH-Agonist Triptorelin führt in 4 von 6 Ovarialkarzinomzelllinien und in 5 von 6 Endometriumkarzinomzelllinien zu einer signifikanten Proliferationsinhibition. Entscheidend dabei ist, daß die Proliferationsinhibition mit der Expression von LHRH-Rezeptoren einhergeht. Die LHRH-Analoga wirken auf die Karzinomzelllinien antiproliferativ, die hochaffine LHRH-Bindungsstellen exprimieren. In den Zelllinien, die keine LHRH-Bindungsstellen aufweisen, konnten keine wachstumshemmenden Effekte durch LHRH demonstriert werden. Bis auf die bereits erwähnte Diskrepanz bei der Ovarialkarzinomzelllinie EFO-27 zeigt der LHRH-Antagonist Cetrorelix bei allen Zelllinien eine ebenfalls signifikante Wachstumsreduktion zwischen 30 und 40 %. Dennoch scheint aber der Wirkmechanismus von LHRH-Analoga keinem einheitlichen Prinzip allgemein für Karzinomzellen zu folgen und es liegen offensichtlich unterschiedliche Reaktionsmechanismen in unterschiedlichen Geweben vor.

Die weitreichenden biologischen Aktivitäten von LHRH-Analoga bei der Beeinflussung von Ovarial- und Endometriumkarzinomen lassen vermuten, daß LHRH selbst durch die Tumorzellen produziert wird. Da die Wirksamkeit eines autokrinen Stimulans aber erst eintritt, wenn die gebildete Substanz durch die Zellen sezerniert wird, wurde versucht immunologisch reaktives LHRH in konditionierten Kulturmedien nachzuweisen. Quayum et al. (1990a) und Limonta et al. (1992) konnten jedoch nur sehr geringe Mengen detektieren, was durch ungenügend sensitive Versuchsbedingungen und die rasche Degradation des Peptids unter Zellkulturbedingungen erklärt wurde.

Den negativen Ergebnissen bei der Untersuchung der konditionierten Medien stehen jedoch erfolgreiche Versuche gegenüber, die LHRH-Aktivität in Extrakten aus Zellen der

Tumorzelllinien sowie primärem Tumorgewebe demonstrieren konnten. Ohno et al. (1993) und Irmer et al. (1993, 1994) konnten LHRH in Extrakten von Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien nachweisen. Diese Befunde stehen im Einklang mit den Ergebnissen der eigenen Untersuchungen an den im Labor etablierten Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien. Insgesamt wurde in allen untersuchten Zelllinien sowie in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 die Existenz einer Substanz demonstriert, die im RIA spezifisch durch den gegen LHRH polyklonalen gerichteten Antikörper (K-29) erkannt wird. Unter der Berücksichtigung der Tatsache, daß außerdem 32 der 32 Proben (100 %) von Ovarialkarzinomgeweben und 8 der 8 Endometriumkarzinomproben, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, LHRH-Aktivität produzierten, muß man annehmen, daß Karzinomzellen in vivo LHRH bilden und auch sezernieren. Ohno et al. (1993) in Rattengranulosazellen und Irmer et al. (1993, 1994) in Rattenhypophysenzellen konnten darüber hinaus demonstrieren, daß sich die angereicherte LHRH-Immunreaktivität in der Wirkung von authentischem LHRH nicht unterscheiden läßt und ebenso funktional ist.

Es lag daher nahe, nachdem immunologisch reaktive und biologisch wirksame LHRH-Aktivität in Tumorzelllinien und in Proben von Ovarial- Und Endometriumkarzinomzelllinien gezeigt werden konnte, die etablierten Zelllinien und Proben solider Tumoren hinsichtlich der Expression spezifischer LHRH-Bindungsstellen zu überprüfen. Emons et al. (1993b, 1993c) gelang der Nachweis einer hochaffinen Bindungsstelle mit niedriger Kapazität und einer niedrigaffinen Bindungsstelle mit hoher Affinität in Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien. Auch Imai et al. (1994) detektierten hochaffine Bindungsstellen in Proben aus Ovarialkarzinomgeweben. Da die Dissoziationskonstanten der nachgewiesenen hochaffinen Bindungsstelle im nanomolaren Bereich liegen und biologische Wirkungen von LHRH-Agonisten bereits bei diesen Konzentrationen signifikant werden, erscheint die Annahme gerechtfertigt, daß es sich bei dieser Bindungsstelle um einen Rezeptor handelt, durch den die antiproliferativen Effekte der LHRH-Agonisten direkt vermittelt werden. Außerdem sind die beobachteten Bindungseigenschaften vergleichbar mit denen der gonadotropen Hypophysenzellen. Die Authentizität des beschriebenen LHRH-Rezeptors und die genetische Übereinstimmung mit dem hypophysären LHRH-Rezeptor gelang Kakar et al. (1992) und konnte von Irmer et al. (1994, 1994) durch den Nachweis der LHRH-Rezeptor mRNA in Tumorgewebe und Karzinomzelllinien untermauert werden. Es kann somit davon ausgegangen werden, daß diesem Typ der Bindungsstellen bei der Manipulation von Tumorzellen mit LHRH-Analoga eine besondere Bedeutung zukommt. Und weil es sich um einen spezifischen

Rezeptor handelt, scheint die Expression von LHRH-Bindungsstellen bei gynäkologischen Tumoren ein überwiegendes Prinzip zu sein. Hinweise zur Klärung der noch offenen Fragen über die Identität der nachgewiesenen LHRH-Aktivität und der spezifischen Bindungsstellen sollten weitere Versuche auf molekularbiologischer Ebene erbringen.

Die Authentizität der Produktion von LHRH und seines Rezeptors sollte durch die Demonstration der mRNA mit der Sequenz des humanen LHRH und des humanen hypophysären LHRH-Rezeptors in den untersuchten Zelllinien und Tumorseiten nachgewiesen werden. Um die Expression der mRNA für humanes LHRH in den Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien und den entsprechenden Tumorseiten in der RT-PCR nachzuweisen wurden zwei verschiedene Primerpaare eingesetzt, die das gesamte RNA-Transkript abdecken. Die Authentizität der Basensequenz der jeweiligen Amplifikationsprodukte aus der RT-PCR wurde durch Restriktionsverdau und Southern Blot Hybridisierung bestätigt. Die Ergebnisse dieser Experimente sind unter 3.5.1.2. zusammengefaßt. Die mRNA für LHRH konnte in 6/6 Ovarialkarzinomzelllinien, in 6/6 Endometriumkarzinomzelllinien, in 30/32 (94 %) Ovarialkarzinomen und in 7/8 (88 %) Endometriumkarzinomen nachgewiesen werden. Sofern mit dem entsprechenden Material Versuche zum Nachweis der Immunreaktivität stattgefunden haben, stimmen die jeweiligen Ergebnisse überein (vgl. Tab. III-4). Außer bei zwei Ovarialkarzinomen und einem Endometriumkarzinom konnten nur eine sehr schwache Amplifikation nachgewiesen werden. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich an der Auswahl des Gewebestückes zur Gesamt-RNA-Präparation. Durch die geringe Menge an Gewebe kann es passieren, daß der Anteil an gutartigem Gewebe die Menge an Tumorseite dominiert. Es konnte so durch die RT-PCR gezeigt werden, daß es sich bei der LHRH-Immunreaktivität um authentisches LHRH handelt. Gleichmaßen wurden die verschiedenen RNA-Präparationen auch auf die Expression von mRNA mit der Basensequenz des Gens für den humanen hypophysären LHRH-Rezeptor überprüft. Für diese Versuch wurden neben eines eigens konzipierten Primerpaares (vgl. 2.4.2.3., Primerpaar Nr. 2) die von Kakar et al. (1992) etablierten Oligonukleotidprimer herangezogen. Als Positivkontrolle diente RNA der Mammakarzinomzelllinie MCF-7, die bekanntmaßen (Kakar et al. 1992) die mRNA für den LHRH-Rezeptor exprimiert. Von den untersuchten Ovarialkarzinomzelllinien exprimierten EFO-21, EFO-27, NIH: Ovar-3 und BG-1 die LHRH-Rezeptor-mRNA, nicht aber die Zelllinien SK-OV-3 und SW 626. Bei den Endometriumkarzinomzelllinien konnte in allen RNA-Präparationen (Ishikawa, HEC-1A, HEC-1B, AN-3-CA, KLE und MFE-296) mit dem

Primerpaar Nr. 2 die gesuchte mRNA demonstriert werden. Mit dem etablierten Primerpaar Nr. 1 konnte außer bei den Zelllinien Ishikawa und HEC-1A eine LHRH-Rezeptor-mRNA gefunden werden. Dies ist dahingehend bemerkenswert, als daß in diesen Zelllinien spezifische Bindungsstellen für LHRH auf Proteinebene und auch antiproliferative Effekte von LHRH-Analoga aufgezeigt wurden. Legt man hier nur die Ergebnisse zugrunde, die mit dem Primerpaar Nr. 2 erzielt wurden, so kommt man zu der Erkenntnis, daß in den untersuchten Ovarialkarzinomzelllinien, die eine LHRH-Bindungsstelle aufweisen, auch die Expression der LHRH-Rezeptor-mRNA nachgewiesen werden konnte. Dies gilt im gleichen Maße für die untersuchten Endometriumkarzinomzelllinien bei denen nur die MFE-296 die Ausnahme bildet. Hier konnte zwar eindeutig die LHRH-Rezeptor-mRNA-Expression demonstriert werden, allerdings wies die Zelllinie keine LHRH-Rezeptor-Bindungsstellen auf und wurde durch LHRH-Analoga nicht antiproliferativ beeinflusst. Bei den untersuchten Tumorproben von Ovarialkarzinomen konnte in 78 % (25 von 32) der Fälle DNA mit der Basenfolge des Gens für den humanen LHRH-Rezeptors amplifiziert werden. Von den 8 untersuchten Endometriumkarzinom-Proben reagierten 6 positiv (75 %). Die positiven beziehungsweise negativen Ergebnisse der PCR-Analysen wurden dabei jeweils durch Southern Blot-Analysen und Restriktionsanalysen bestätigt. Um die Diskrepanz bei der Amplifikation der mRNA für den LHRH-Rezeptor mit den verschiedenen Primerpaaren bei den Endometriumkarzinomzelllinien Ishikawa und HEC-1A zu erklären, wurde das Amplifikationsprodukt auf einen Defekt analysiert und kommerziell sequenziert. Allerdings konnte auch hier nur die Sequenz des humanen hypophysären LHRH-Rezeptors reproduziert werden. Außerdem stehen die Ergebnisse im Widerspruch zu den Daten von Imai et al. (1994), die in RNA-Präparationen von SK-OV-3-Zellen die mRNA für den LHRH-Rezeptor mit anderen Primerkombinationen in der PCR nachweisen konnten. Da die Autoren jedoch für ihre Untersuchungen von poly(A)⁺-RNA anstelle von Gesamt-RNA ausgingen, ist es möglich, daß der gewählte RT-PCR-Ansatz trotz seiner Spezifität noch immer verbesserungsbedürftig bleibt.

Alle bisher erbrachten Ergebnisse sprechen für die Möglichkeit, daß LHRH in Form einer autokrinen Regulation Einfluß auf das Wachstum von Tumoren nimmt, zumal es auf Grund der kurzen Halbwertszeit unwahrscheinlich scheint, daß endogen im Hypothalamus gebildetes LHRH die Konzentrationen im peripheren Blut erreicht, die notwendig sind, um die LHRH-Rezeptoren zu stimulieren. Die vorliegenden Resultate und die Ergebnisse früherer Untersuchungen (Emons et al. 1993b und 1993c) zeigen, daß in 4 von 6 Ovarialkarzinomzelllinien (EFO-21, EFO-27, NIH: Ovarcar-3, BG-1) und in 5 von 6 Endometrium-

karzinomzelllinien (Ishikawa, HEC-1A, HEC-1B, AN-3-CA, KLE) sowie in 80 % (32 von 40) der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Ovarial- und Endometriumkarzinom sämtliche Komponenten für ein autokrines Regulationssystem exprimieren. Die genannten Proben zeigen antiproliferative Effekte durch LHRH-Analoga, die Produktion von LHRH-Immunreaktivität, die mRNA für humanes LHRH, spezifische hochaffine LHRH-Bindungsstellen und die mRNA für den humanen LHRH-Rezeptor. Die einzige Ausnahme bildet die Endometriumkarzinomzelllinie MFE-296, die zwar alle genetischen Voraussetzungen für ein autokrines Regulationssystem basierend auf LHRH mitbringt (LHRH-mRNA-Expression, LHRH-Immunoreaktivität, LHRH-Rezeptor-mRNA-Expression), bei der aber nicht der Nachweis der spezifischen hochaffinen Bindungsstellen und die antiproliferativen Effekte von LHRH-Analoga gelangen. Hier deutet alles auf einen Defekt bei der Umsetzung der genetischen Information für den LHRH-Rezeptor zum fertigen Rezeptorprotein hin, das nicht demonstriert werden konnte.

Durch den Nachweis der Expression von LHRH und seines Rezeptors in Ovarial- und Endometriumkarzinomen ist so die Existenz eines auf LHRH basierenden autokrinen Systems wahrscheinlich geworden. Eindeutig ist auch die Tatsache, daß die Proliferation der Tumorzellen durch Agonisten und Antagonisten von LHRH negativ beeinflußt werden kann. Dieses autokrine System ist zumindest in vitro und im Nacktmausmodell ein Target für LHRH-Agonisten und insbesondere Antagonisten (zur Übersicht Emons et al. 1996a, 1996b), über das die Proliferation dieser Tumoren effektiv gehemmt wird. Es stellt sich die Frage, ob LHRH-Analoga in den Tumoren, ähnlich wie sie es in der Hypophyse tun, eine Down-Regulation der LHRH-Rezeptoren induzieren. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, daß die Frequenz und die Amplitude der pulsatilen LHRH-Sekretion in gonadotropen Zellen in direktem Zusammenhang mit der Freisetzung von LH und FSH stehen. Kontinuierliche Behandlungen mit hohen Dosen LHRH oder LHRH-Analoga führen zu einem Zustand, den man als medikamentöse Kastration bezeichnet. Der zugrunde liegende Mechanismus dieses Effektes ist eine Desensitivierung der gonadotropen Zellen, welche die Quantität der LHRH-Rezeptoren drastisch verringert. Diesen Vorgang definiert man als Rezeptor-Down-Regulation (zur Übersicht Schally et al. 1993, Emons und Schally 1994a). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß es in den untersuchten Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien (EFO-21, EFO-27, Ishikawa und HEC-1A) nach 96 h Behandlung weder mit dem LHRH-Agonisten Triptorelin noch mit dem LHRH-Antagonisten Cetrorelix in den Konzentrationen 10^{-5} mol/L gelingt die Rezeptordichte drastisch zu

reduzieren. In dem durchgeführten Ansatz wurde hier mit Hilfe des etablierten Radiorezeptorassays und dem Abwaschen der LHRH-Analoga von den Rezeptoren (vgl. Szöke et al. 1994) eine maximale Reduktion der hochaffinen LHRH-Bindungsstellen durch LHRH-Analoga um 15 – 20 % erreicht. Im gleichen Maße wurde auch die LHRH-Rezeptor-mRNA-Expression unter Verwendung einer quantitativen RT-PCR analysiert, mit einem ähnlichen Ergebnis. Die Behandlung mit den LHRH-Analoga führte auch hier nur zu einem Expressionsrückgang von 20 – 25 %. Deutlich zu sehen ist allerdings, daß es bei der Behandlung der Zelllinien keinen Unterschied gibt zwischen Agonisten und Antagonisten. Dies ist für die Zelllinien EFO-21, Ishikawa und HEC-1A wenig verwunderlich. Bei der Zelllinie EFO-27 hingegen schon, denn diese Zelllinie zeigt ein grundsätzlich verschiedenes proliferatives Verhalten gegenüber Agonisten und Antagonisten. Während die Zelllinie EFO-27 durch den Agonisten Triptorelin signifikant gehemmt werden konnte (vgl. 3.2.1.), zeigte der Antagonist Cetrorelix keine proliferationshemmende Wirkung (vgl. 3.2.2.). Um so erstaunlicher ist es, daß aber Cetrorelix in der gleichen Größenordnung wie Triptorelin sowohl die LHRH-Rezeptor-mRNA-Expression als auch die Quantität der hochaffinen LHRH-Bindungsstellen herunterreguliert. Dies und die anderen Ergebnisse lassen darauf schließen, daß der regulative Mechanismus, der zu der quantitativen Rezeptorreduktion führt, nicht oder nur wenig für die antiproliferative Wirkung von LHRH-Analoga verantwortlich ist. Unterstützt wird dieser Punkt durch die Tatsache, daß sich die Wirkungen von LHRH-Agonisten und LHRH-Antagonisten nicht signifikant unterscheiden. Die Beantwortung der Frage, ob LHRH-Analoga eine Down-Regulation in den Tumorzellen ähnlich wie in Hypophysenzellen induzieren, muß verneint werden. Allerdings kann vermutet werden, daß die Reduktion der LHRH-Rezeptordichte unter dem Einfluß von LHRH-Analoga einen Teil der antiproliferativen Effekte vermittelt aber nicht ausschließlich dafür verantwortlich ist.

Nachdem die vorangegangenen Untersuchungen gezeigt haben, daß die antiproliferativen Effekte von LHRH-Analoga nicht unmittelbar durch eine quantitative Rezeptor-(Down)-Regulation hervorgerufen werden, soll im Folgenden geklärt werden, ob durch LHRH-Analoga die Phosphorylierung des EGF-Wachstumsfaktorrezeptors vermindert wird. Angesichts der scheinbaren Ähnlichkeit zwischen den LHRH-Rezeptoren in Ovarialbeziehungsweise Endometriumkarzinomen und denen in der Hypophyse schien es zunächst nahezuliegen, zu vermuten, daß auch die LHRH-Signaltransduktionsmechanismen in den Tumoren ähnlich sind wie in der Hypophyse, also über Phospholipase C (PLC), Proteinkinase C (PKC) und Adenylatcyclase vermittelt werden. Emons et al. (1996c, 1998) konnten mit

Hilfe von einschlägigen pharmakologischen Stimuli in Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien PLC, PKC und Adenylatcyclase aktivieren. Dies gelang aber nicht mit dem LHRH-Agonisten Triptorelin in Konzentrationen, die eindeutig antiproliferativ wirksam waren. Emons et al. (1996c) und Müller (1996) kommen so zu der Schlußfolgerung, daß die Signaltransduktionsmechanismen, die in der Hypophyse die LHRH-Effekte vermitteln, für die antiproliferativen Effekte von LHRH-Analoga in Tumorzellen nicht essentiell sind. Außerdem gelang die Demonstration, daß die mitogenen Effekte von Wachstumsfaktoren (epidermal growth factor, EGF; insulin like growth factor-1, IGF-1) auf die untersuchten Ovarial- (EFO-21, EFO-27) und Endometriumkarzinomzelllinien (Ishikawa, HEC-1A) durch die Behandlung mit dem LHRH-Agonisten Triptorelin völlig aufgehoben werden konnten (Emons et al. 1996c). In diesem Zusammenhang standen die Ergebnisse, daß die EGF-induzierte Nettosphosphorylierung in den Karzinomzelllinien durch Triptorelin gehemmt wurde. In einem gleichen Ansatz aber gelang die Antagonisierung dieses Effektes durch den Phosphatase Inhibitor Vanadat. Ebenso gelang die Inhibition der wachstumsfaktorinduzierten Tyrosinkinase Aktivität des EGF-Rezeptors durch simultane Inkubation mit Triptorelin. Dieser Effekt von Triptorelin konnte ebenfalls durch Vanadat antagonisiert werden (Müller 1996, zur Übersicht: Emons et al. 1998) Vergleichbare Daten lieferte Moretti et al. (1996) für die humanen Prostatakarzinomzelllinien LNCaP und DU 145. Diesen Effekten liegt eine Antagonisierung der wachstumsfaktorinduzierten Tyrosinkinase zugrunde. Die wachstumsfaktorinduzierte Tyrosinphosphorylierung wird durch LHRH-Analoga durch die Aktivierung einer Tyrosinphosphatase antagonisiert und dadurch die mitogene Signaltransduktion gleich an ihrer ersten Stelle blockiert (zur Übersicht Emons et al. 1997, 1998). Die Arbeitsgruppe von Imai (1996a, 1996b) konnte zeigen, daß diese Phosphotyrosinphosphatase durch ein Gi-Protein an die LHRH-Rezeptoren in menschlichen Ovarial- und Endometriumkarzinomen gekoppelt ist. Die Tatsache, daß der LHRH-Rezeptor in humanen Tumoren nicht an ein Gq-Protein wie in der Hypophyse, sondern an ein Gi-Protein koppelt, könnte die unterschiedlichen Signaltransduktionswege beider Systeme erklären. Auch die Beobachtung, daß sich die LHRH-Antagonisten in den meisten Tumoren wie LHRH-Agonisten verhalten, könnte hierin eine Erklärung finden. Das Konzept der Inhibition der mitogenen Signaltransduktion in humanen Tumoren konnte durch verschiedene Arbeitsgruppen weiter erhärtet werden. Emons et al. (1996c) zeigten, daß die durch EGF-induzierte Aktivierung der mitogen activated protein Kinase (MAPK), ein Mechanismus, der weiter down-stream in der Wachstumsfaktorsignalkaskade angesiedelt ist, in Ovarial- und Endometriumkarzinomzellen durch den LHRH-Agonisten Triptorelin fast vollständig

blockiert wird. Gründker et al. (1999) demonstrierte die komplette Unterdrückung der EGF-induzierten Expression des immediate early Gens *c-fos* sowohl durch die Behandlung mit LHRH-Agonisten Triptorelin und dem LHRH-Antagonisten Cetrorelix. Der gleiche Effekt konnte bei der Behandlung der Prostatakarzinomzelllinie LNCaP mit dem LHRH-Agonist Goserelin beobachtet werden (Moretti et al. 1996). Andere Arbeitsgruppen wiesen außerdem nach, daß LHRH-Antagonisten die Expression von Wachstumsfaktorrezeptoren und ihrer mRNA in Nacktmausmodellen menschlicher Ovarialkarzinome reduzieren (Yano et al. 1994b, Shirahige et al. 1994).

In der vorliegenden Arbeit sollten nun die bisherigen Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Emons (zur Übersicht Emons et al. 1997) zur Beeinflussung der wachstumsfaktorinduzierten Tyrosinkinaseaktivität dahingehend erweitert werden, daß geprüft wurde, ob durch die LHRH-Analoga Triptorelin und Cetrorelix die Phosphorylierung der Rezeptortyrosinkinase vermindert wird. Mit einer semiquantitativen Western-Blot-Analyse konnte für die Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien (EFO-21, EFO-27, Ishikawa, HEC-1A) unter dem Einfluß des LHRH-Agonisten Triptorelin eine Reduktion der EGF-induzierten Rezeptor-Tyrosinautophosphorylierung um 60 – 80 % demonstriert werden. Die gleichen Ergebnisse erbrachte die Behandlung der Zelllinien mit dem LHRH-Antagonisten Cetrorelix. Der zugrunde liegende Effekt liegt also sicherlich in einer Antagonisierung der wachstumsfaktorinduzierten Tyrosinkinase, wobei die wachstumsfaktorinduzierte Tyrosinphosphorylierung unter dem Einfluß von LHRH-Analoga durch die Aktivierung einer Tyrosinphosphatase antagonisiert wird und dadurch die mitogene Signaltransduktion gleich an ihrer ersten Stelle blockiert. Erstaunlich sind auch hier wieder die gleichermaßen beobachteten Effekte von Agonisten und Antagonisten auf den mitogenen Signaltransduktionsmechanismus in den untersuchten Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien. Prinzipiell scheint es keinen Unterschied zu machen, ob bei der Bindung an den LHRH-Rezeptor ein LHRH-Agonist oder ein LHRH-Antagonist vorliegt. In beiden Fällen wird vermutlich eine Phosphotyrosinphosphatase aktiviert, die die wachstumsfaktorinduzierte Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptors inhibiert und damit die antiproliferative Wirkung vermittelt. Diskutiert werden muß allerdings hier die Sonderstellung der Ovarialkarzinomzelllinie EFO-27. Diese Zelllinie besitzt alle Bestandteile für das auf LHRH basierende autokrine Regulationssystem: LHRH-Expression und LHRH-Rezeptor-Expression. Ferner wird die Zelllinie EFO-27 durch den LHRH-Agonisten Triptorelin signifikant in ihrem Wachstum gehemmt. Kein antiproliferativer Effekt hingegen konnte mit dem LHRH-Antagonisten Cetrorelix erreicht werden. Unter dem Einfluß von Cetrorelix wird

jedoch genau wie durch Triptorelin die wachstumsfaktorinduzierte EGF-Rezeptor-Autophosphorylierung signifikant reduziert. In den zellulären signalauslösenden Mechanismen der EFO-27 Zellen wirkt also der Agonist genauso wie der Antagonist. Der Unterschied in der Wirkung des Antagonisten auf die intrazelluläre Signalweiterleitung muß also weiter down-stream in der mitogenen Signaltransduktionskaskade liegen. Um die nicht demonstrierten antiproliferativen Effekte von Cetrorelix erklären zu können, muß die Frage beantwortet werden, ob die eingeschlagene Signaltransduktion in irgendeiner Art und Weise antagonisiert oder umgangen wird.

Weiter geklärt werden müßte dahingehend auch hier die Frage, ob LHRH-Analoga neben der Phosphorylierung der Wachstumsfaktorrezeptoren auch die Phosphorylierung weiterer intrazellulärer Proteine vermindern und/oder damit mit den verschiedenen Signaltransduktionskaskaden interagieren.

Trotz einiger noch offener Fragen kann zusammenfassend festgestellt werden, daß die Daten verschiedener Arbeitsgruppen und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sich gegenseitig bestätigen und ergänzen. Es konnte das Vorliegen eines autokrinen regulatorischen Systems mit LHRH als Botenstoff in Ovarial- und Endometriumkarzinomen demonstriert werden. Außerdem unterstützen die Daten die Vermutung, daß die antiproliferativen Effekte von LHRH-Analoga in einem großen Anteil durch die Inhibition des mitogenen Wachstumsfaktor-Signaltransduktionsweges vermittelt werden. Weitere Forschungen sind jedoch unbedingt notwendig, um zu klären, welche funktionelle Bedeutung dieses autokrine System für eine Verbesserung der Therapie dieser Karzinome auf endokriner Ebene hat. Außerdem bedarf es weiterer Untersuchungen, ob durch Interaktionen mit LHRH-Agonisten und LHRH-Antagonisten Proliferationshemmungen in vivo erzielt und LHRH-Analoga in einem therapeutischen Konzept gewinnbringend angewendet werden können.

5. Zusammenfassung

In verschiedenen Ovarial- und Endometriumkarzinomzellen konnten seit Mitte der achtziger Jahre zeit- und dosisabhängig antiproliferative Effekte von LHRH und seinen modernen Analoga (LHRH-Agonisten und -Antagonisten) demonstriert werden. Desweiteren wurden in den verschiedenen Zelllinien aber auch in soliden Tumoren die Produktion von LHRH-Immunreaktivität, LHRH-mRNA, spezifische hochaffine Bindungsstellen und die LHRH-Rezeptor-mRNA nachgewiesen werden. Da man davon ausgehen muß, daß LHRH in den lokalen Systemen der Ovarial- und Endometriumtumoren einen direkten Einfluß auf Proliferation und Differenzierung der Tumorzellen nimmt, sollten die Experimente der vorliegenden Arbeit klären, ob Ovarial- und Endometriumkarzinome LHRH und seinen spezifischen Rezeptor als Form eines autokrinen Regulativen System exprimieren und ob durch Behandlung mit LHRH-Analoga die Rezeptoren-Dichte beeinflußt werden kann. Außerdem sollte der Signaltransduktionsmechanismus der wachstumsfaktorinduzierten Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptors untersucht werden. Für die Untersuchung standen mehrere Tumorzelllinien sowie verschiedene Tumorgewebeproben zur Verfügung.

1.) Untersuchungen zur direkten Wirkung von LHRH-Analoga auf Tumorzellen in Kultur: Die postulierte zeit- und dosisabhängigen proliferationshemmenden Wirkungen des LHRH-Agonisten Triptorelin und des LHRH-Antagonisten Cetrorelix auf verschiedene Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien konnten durch Proliferationsassays bestätigt werden. Die Ovarialkarzinomzelllinien EFO-21 und die Endometriumkarzinomzelllinien Ishikawa und HEC-1A konnten durch Triptorelin und Cetrorelix signifikant gehemmt werden. Die Ovarialkarzinomzelllinie EFO-27 hingegen wurde nur durch den LHRH-Agonisten Triptorelin, nicht aber durch den LHRH-Antagonisten Cetrorelix signifikant gehemmt.

2.) Nachweis der LHRH-Immunreaktivität: Mit Hilfe von radioimmunologischen Untersuchungen konnte in Proteinextrakten der Ovarialkarzinomzelllinien EFO-21, EFO-27, NIH: Ovarcar-3, BG-1, SK-OV-3, SW 626 und den Endometriumkarzinomzelllinien Ishikawa, HEC-1A, HEC-1B, KLE, AN-3-CA, MFE-296 sowie der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 LHRH-Immunreaktivität detektiert werden (im Bereich von 155 – 458 fmol/10⁶ Zellen). Ebenfalls untersucht wurden Proteinextrakte von 32 Ovarialkarzinomen und 8 Endometriumkarzinomen. Die gemessenen Werte im LHRH-RIA lagen dabei zwischen 2 und

48 pg/mg Protein. Dabei exprimierten 100 % (32 von 32) der Ovarialkarzinome und 100 % (8 von 8) der Endometriumkarzinome eine LHRH-Immunreaktivität.

3.) Nachweis von LHRH-Bindungsstellen in Zelllinien und Tumorgewebe: Sechs Ovarial-, sechs Endometrium- und eine Mammakarzinomzelllinie sowie 40 Ovarial- und Endometriumkarzinome wurden in einem spezifischen Radiorezeptorassay auf die Expression von LHRH-Bindungsstellen untersucht. Bei vier Ovarial- (EFO-21, EFO-27, NIH: Ovarcar-3, BG-1), fünf Endometriumkarzinomzelllinien (Ishikawa, HEC-1A, HEC-1B, KLE, AN-3-CA) und der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 konnte jeweils eine hochaffine Bindungsstelle (K_d 1,5 – 8,2 nmol/L) nachgewiesen werden. Die beiden Ovarialkarzinomzelllinien SK-OV-3 und SW 626 und die Endometriumkarzinomzelllinie MFE 296 reagierten negativ. Bei der Untersuchung der Tumoren zeigten 78 % (25 von 32) der Ovarialkarzinome und 75 % (6 von 8) der Endometriumkarzinome hochaffine Bindungsstellen (K_d 0,1 – 90 nmol/L).

4.) Nachweis der mRNA für LHRH: Aus den in 2.) und 3.) erwähnten Zelllinien und den Tumoren wurden zunächst RNA-Präparationen gewonnen, diese in der PCR eingesetzt und mit spezifischen Primersequenzen für humanes LHRH hybridisiert. Die Expression der mRNA mit der gesuchten Basensequenz konnte in allen Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien sowie in 94 % (30 von 32) der malignen Tumoren des Ovars und in 88 % (7 von 8) Endometriumkarzinomproben nachgewiesen werden. Die Ergebnisse wurden durch spezifische Restriktionsanalysen und durch Southern Blot-Hybridisierungen bestätigt.

5.) Nachweis der mRNA für den LHRH-Rezeptor: Durch Untersuchungen mit der RT-PCR konnte in 67 % (4 von 6) Ovarialkarzinomzelllinien und in 100 % (6 von 6) Endometriumkarzinomzelllinien die mRNA für den hypophysären LHRH-Rezeptor demonstriert werden. Bei den untersuchten Tumorproben von Ovarialkarzinomen reagierten 78 % (25 von 32) positiv. Von Endometriumkarzinomen konnten in 75 % (6 von 8) der Fälle DNA mit der Basenfolge des humanen hypophysären LHRH-Rezeptors amplifiziert werden.

6.) Nachweis der Regulation der LHRH-Rezeptor-mRNA-Expression unter Einfluß von LHRH-Analoga: In einer semiquantitativen RT-PCR wurde die Regulation der LHRH-Rezeptor-mRNA-Expression unter dem Einfluß der LHRH-Analoga Triptorelin (LHRH-Agonist) und Cetrorelix (LHRH-Antagonist) im zeitlichen Verlauf in den

Ovarialkarzinomzelllinien EFO-21 und EFO-27 sowie den Endometriumkarzinomzelllinien Ishikawa und HEC-1A analysiert. In allen Zelllinien zeigte sich nach 96 h Inkubation mit dem jeweiligen LHRH-Analogen eine Reduktion der mRNA-Expression für den LHRH-Rezeptor auf 75 – 85 % gegenüber einer täglichen Kontrolle.

7.) Nachweis der Regulation der LHRH-Rezeptordichte unter Einfluß von LHRH-Analoga: Für die Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien (EFO-21, EFO-27, Ishikawa und HEC-1A) wurde die Reduktion der spezifischen hochaffinen LHRH-Bindungsstellen nach 96 h Inkubation mit den LHRH-Analoga Triptorelin und Cetrorelix untersucht. Es zeigt sich, daß unter dem Einfluß von LHRH-Agonisten und –Antagonisten die Anzahl der hochaffinen Bindungsstellen um 15 – 22 % gegenüber der Kontrolle reduziert wird.

8.) Antagonisierung der wachstumsfaktorinduzierten Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptors durch LHRH-Analoga: Mit Hilfe einer semiquantitativen Western-Blot-Analyse wurde untersucht, ob eine durch EGF induzierte Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptors durch LHRH-Analoga in den Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien (EFO-21, EFO-27, Ishikawa HEC-1A) inhibiert werden kann. Für die verschiedenen Zelllinien konnte sowohl unter dem Einfluß des LHRH-Agonisten als auch des LHRH-Antagonisten eine Inhibition der durch EGF induzierten Tyrosinphosphorylierung des Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGF-Rezeptor) zwischen 60 und 80 % demonstriert werden.

6. Literatur

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1991):
Current protocols in molecular biology.
Wiley Interscience, Boston

Baltzer J, Maaßen V (1989):
Präneoplasien und Neoplasien des Endometriums.
In: Wulf KH, Schmidt-Matthiesen H (eds.): Klinik der Frauenheilkunde und Geburtshilfe.
Spezielle gynäkologische Onkologie II. Urban & Schwarzenberg, pp 207-251

Bast RC, Boyer CM, Jacobs I, Xu FJ, Wu S, Wiener J, Kohler M, Berchuk A (1993):
Cell growth regulation in epithelial ovarian cancer.
Cancer 71: 1597-1601

Berchuck A, Kohler MF, Bast RC (1992):
Oncogenes in ovarian cancer.
Hematol/Oncol Clinics of North America 6: 813-827

Berchuck A, Kohler MF, Boente MP, Rodriguez GC, Whitaker RS, Bast RC (1993):
Growth regulation and transformation of ovarian epithelium.
Cancer 71: 545-551

Bertram S, Gassen HG (1991):
Gentechnische Methoden.
Gustav Fischer Verlag; Stuttgart, Jena, New York

Bishop JM (1991):
The molecular genetics of cancer.
Science 235: 305-311

Boltz EM, Kefford RF, Leary JA, Houghton CR, Friedlander ML (1989):

Amplification of *c-ras*-Ki oncogene in human ovarian tumors.

Int J Cancer 43: 428-430

Boman K, Strang P, Bäckström T, Stendahl U (1993):

The influence of progesterone and androgens on the growth of endometrial carcinoma.

Cancer 71: 3565-3569

Borst MP, Baker VV, Dixon D et al. (1990):

Oncogene alterations in endometrial carcinoma.

Gynecol Oncol 38: 364-366

Bradford M (1976):

A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein dye binding.

Anal Biochem 72: 248-254

Bruckner HW, **Motwani BT** (1989):

Treatment of advanced refractory ovarian cancer with a gonadotropin-releasing hormone analogue.

Am J Obstet Gynecol 161: 1216

Burghardt E, Lahousen M, Stettner H (1990):

Die operative Behandlung des Ovarialkarzinoms.

Geburtshilfe und Frauenheilkunde 50: 670-677

Burghardt E, Girardi F, Lahousen M, Tamussino K, Stettner H (1991):

Patterns of pelvic and paraaortic lymph node involvement in ovarian cancer.

Gynecol Oncol 40: 103-106

Casagrande JT, Louie EW, Pike MC, Roy S, Rock RK, Henderson BE (1979):

Incessant ovulation and ovarian cancer.

Lancet 2: 170-173

Chatzaki E, Bax CMR, Eidne KA, Anderson L, Grudzinskas JG, Gallagher CJ (1996):

The expression of gonadotropin-releasing hormone and its receptor in endometrial cancer and its relevance as an autocrine growth factor.

Cancer Res 56: 2055-2065

Cheruku R, Hussain M, Tyrkus M, Edelstein M (1993):

Myelodysplastic syndrome after cisplatin therapy.

Cancer 72: 213-218

Clayton RN, Shakespear RA, Duncan JA, Marshall JC (with appendix by Munson PJ, Rodbard D) (1979):

Radioiodinated non-degradable gonadotropin releasing hormone analogs: New probes for the investigation of pituitary gonadotropin releasing hormone receptors.

Endocrinology 105: 1369-1376

Clayton RN, Eccleston L, Gossard F, Thalbard JC, Morel G (1992):

Rat granulosa cells express the gonadotropin-releasing hormone gene: evidence from in-situ hybridization histochemistry.

J Mol Endocrinol 9: 189-195

Colon-Otero G, Malkasian GP, Edmonson JH (1993):

Secondary myelodysplasia and acute leukemia following carboplatin-containing combination chemotherapy for ovarian cancer.

J Natl Cancer Inst 85: 1858-1860

Dallenbach-Hellweg G, Schmidt-Matthiesen H (1984):

Hyperplasien, Präkanzerosen und Karzinome des Endometriums.

Arbeitsgemeinschaft für Gynäkologische Onkologie (AGO) der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe und der Deutschen Krebsgesellschaft. Mitteilungsblatt 5: 5-6

Dawe J (1964):

AN 3 CA: a cell line with defective estrogen receptor derived from undifferentiated endometrial cancer.

J Natl Cancer Inst 33: 441-456

De Souza PL, Friedlander ML (1992):

Prognostic factors in ovarian cancer.

Hematol/Oncol Clinics of North America 6: 761-781

Duc-Nguyen H, Rosenblum EN, Zeigel R (1966):

Persistent infection of a rat kidney cell line with Rauscher Murine Leukemia Virus.

J Bacteriol 92: 1133-1140

Eidne KA, Flanagan CA, Harris NS, Millar RP (1987):

Gonadotropin releasing hormone (GnRH)-binding sites in human breast cancer cell lines and inhibitory effects of GnRH antagonists.

J Clin Endocrinol Metab 64: 425-432

Emanuele NV, Emanuele MA, Tentler J, Kirsteins L, Azad N, Lawrence AM (1990):

Rat spleen lymphocytes contain an immunoactive and bioactive luteinizing-hormone releasing hormone.

Endocrinology 126: 2482-2486

Emons G, Pahwa GS, Brack C, Sturm R, Oberheuser F, Knuppen R (1989):

Gonadotropin releasing hormone binding sites in human epithelial ovarian carcinomata.

Eur J Cancer Clin Oncol 25: 215-221

Emons G, Ortmann O, Pahwa GS, Oberheuser F, Schulz KD (1992a):

LH-RH agonists in the treatment of ovarian cancer.

In: Höffken K (ed.): Peptides in Oncology I, LH-RH agonists and antagonists. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo, p 55

Emons G, Ortmann O, Pahwa GS, Hackenberg R, Oberheuser F, Schulz KD (1992b):

Intracellular actions of gonadotropic and peptide hormones and the therapeutic value of the GnRH-agonists in ovarian cancer.

Acta Obstet Gynecol Scand Suppl 155: 31

Emons G, Ortmann O, Schulz KD (1993a):

Rolle der endokrinen Therapie beim Ovarialkarzinom.

Gynäkologie 26: 123-130

Emons G, Ortmann O, Becker M, Irmer G, Springer B, Laun R, Hölzel F, Schulz KD, Schally AV (1993b):

High affinity binding and direct antiproliferative effects of LH-RH analogues in human ovarian cancer cell lines.

Cancer Res 53: 5439-5446

Emons G, Schröder B, Ortmann O, Westphalen S, Schulz KD, Schally AV (1993c):

High affinity binding and direct antiproliferative effects of luteinizing hormone-releasing hormone analogs in human endometrial cancer cell lines.

J Clin Endocrinol Metab 77: 1458-1464

Emons G, Schally AV (1994):

The use of luteinizing releasing hormone agonists and antagonists in gynecological cancers.

Hum Reprod 9: 1364-1379

Emons G, v. Stuckrad B, Ortmann O, Schulz KD, Schally AV (1994)

Effects of analogues of LH-RH and somatostatin on IGF-1 or EGF induced proliferation of endometrial cancer cells.

Exp Clin Endocrinol 102: 116 (Suppl. 1)

Emons G, Schulz KD (1995):

New developments in the hormonal treatment of endometrial and ovarian cancer.

In: Jonat W, Kaufmann M, Munk K (eds.): Hormone dependent tumors, basic research and clinical studies.

Contrib Oncol, Karger, Basel 50: 277-297

Emons G, Grossmann G, Ortmann O, Schulz KD, Schally AV (1995):

Effects of analogues of LH-RH and somatostatin on IGF-1 or EGF induced proliferation of the EFO-21 human ovarian cancer cell line.

Exp Clin Endocrinol 103: 172 (Suppl. 1)

Emons G, Schulz KD (1996):

Growth regulation of epithelial ovarian cancer by hormones, peptide growth factors and cytokines.

In: Pasqualini JR, Katzenellenbogen BS (eds.): Hormone dependent cancer. Marcel Dekker, New York, pp 509-539

Emons G, Ortmann O, Irmer G, Müller V, Schulz KD, Schally AV (1996a):

Treatment of ovarian cancer with LH-RH antagonists.

In: Filicori M, Flamigni C (eds.): Treatment with GnRH analogs: controversies and perspectives. Carnforth, UK: Parthenon, pp 165-72

Emons G, Ortmann O, Schulz KD (1996b):

GnRH analogues in ovarian, breast and endometrial cancers.

In: Lunenfeld B, Insler V (eds.): GnRH Analogues, The State of the Art 1996. Parthenon, Carnforth pp 95-120

Emons G, Müller V, Ortmann O, Grossmann G, Trautner U, v. Stuckrad B, Schulz KD, Schally AV (1996c):

Luteinizing hormone-releasing hormone agonist triptorelin antagonizes signal transduction and mitogenic activity of epidermal growth factor in human ovarian and endometrial cancer cell lines.

Int J Oncol 9: 1129-1137

Emons G, Ortmann O, Schulz KD, Schally AV (1997):

Growth-inhibitory actions of analogues of luteinizing hormone releasing hormone on tumor cells.

Trends Endocrinol Metab 9: 355-362

Emons G, Müller V, Ortmann O, Schulz KD (1998):

Effects of LHRH-analogues on mitogenic signal transduction in cancer cells.

J Steroid Biochem 65: 199-206

Fathalla MF (1971):

Incessant ovulation – a factor in ovarian neoplasia?

Lancet 2: 163

Fedorcsak I, Ehrenberg L (1966):

Effects of diethylcarbonate and methansulfonate on nucleic acids and nucleases.

Acta Chem Scand 20: 107

Foekens JA, Klijn JGM (1992):

Direct antitumor effects of LH-RH analogs.

Recent Results Cancer Res. 124: 7-17

Fogh J, Wright WC, Loveless JD (1977):

Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors.

J Natl Cancer Inst 58: 209-214

Freedman RS, Saul PB, Edwards CL, Jolles CJ, Gershenson DM, Jones LA, Atkinson EN, Dana WJ (1986):

Ethinyl estradiol and medroxyprogesterone acetate in patients with epithelial ovarian carcinoma: A phase II study.

Cancer Treat Rep 70: 369

Fuchtner C, Manetta A, Walker JL, Emma D, Berman M, Di Saia PJ (1992):

Radical hysterectomy in the elderly patient: analysis of morbidity.

Am J Obstet Gynaecol 166: 593-597

Furui T, Imai A, Takagi H, Horibe S, Fuseya T, Tamaya T (1995):

Phosphotyrosine phosphatase activity in membranes from endometrial carcinoma.

Oncol Rep 2: 1055-1057

Gallagher CJ, Oliver RTD, Oram DH, Fowler CG, Blake PR, Mantell BS, Slevin ML, Hope-Stone HF (1991):

A new treatment for endometrial cancer with gonadotropin releasing hormone analogue.

Cancer 63: 280-288

Geisinger KR, Kute TE, Pettenati MJ, Welander CE, Dennard Y, Collins LA, Berens ME (1989):

Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors.

Cancer 71: 530-536

Godwin AK, Testa JR, Hamilton TC (1993):

The biology of ovarian cancer development.

Cancer 71: 530-536

Gründker C, Völker P, Herrmann L, Schulz KD, Emons G (1998):

GnRH inhibits the EGF-induced c-fos expression in endometrial and ovarian cancer.

Archives of Gynecology and Obstetrics 261 Suppl. 1:146

Gründker C, Emons G (1999):

Mechanisms of action.

In Lunenfeld B (ed.): GnRH Analogues, The State of the Art 1999. Carnforth, Parthenon Publishing (in press)

Gründker C, Völker P, Schulz KD, Emons G (1999):

GnRH agonists and antagonists inhibit the EGF-induced c-fos expression in endometrial, ovarian and breast cancer cell lines.

Exp Clin Endocrinol Diab in press

Hackenberg R, Beck S, Filmer A, Hushmand Nia A, Kunzmann R, Koch M, Slater EP, Schulz KD (1994):

Androgen responsiveness of the human endometrial cancer cell line MFE-296.

Int J Cancer 57: 117-122

Hacker NF (1991):

Surgery for endometrial carcinoma.

In: Kleine W, Meerpohl HG, Pflöderer A, Profous CZ (eds.): Therapie des Endometriumkarzinoms. Springer Verlag, pp. 83-90

Hamilton TC, Young RC, McKoy WM, Grotzinger KR, Green JA, Chu EW, Whang-Peng J, Rogan AM, Green WR, Ozols RF (1983):

Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH: OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors.

Cancer Res 43: 5379-5389

Hand R, Fremgen A, Chmiel JS, Recant W, Berk R, Sylvester J, Sener S (1993):

Staging procedures, clinical management, and survival outcome for ovarian carcinoma.

JAMA 269: 1119-1122

Harris N, Dutlow C, Eidne K, Dong KW, Roberts J, Millar R (1991):

Gonadotropin-releasing hormone gene expression in MDA-MB-231 and ZR-75-1 breast carcinoma cell lines.

Cancer Res 51: 2577-2581

Hatch KD, Beecham JB, Blessing JA, Creasman WT (1991):

Responsiveness of patients with advanced ovarian carcinoma to tamoxifen.

Cancer 68: 269-271

Holley RW (1975)

Control of growth of mammalian cells in cell culture.

Natur 258: 487-490

Hoskins WJ (1993):

Surgical staging and cytoreductive surgery of epithelial ovarian cancer.

Cancer 71: 1534-1540

Hsieh KP, Martin TFJ (1992):

Thyrotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptor activate phospholipase C by coupling to the guanosine triphosphate-binding proteins G_q and G_{11} .

Mol Endocrinol 6: 1673-1681

Hunter T (1995):

Protein kinases and phosphatases: The Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling.

Cell 80: 225-236

Imai A, Ohno T, Iida K, Fuseya T, Furui T, Tamaya T (1994):

Gonadotropin releasing hormone receptors in gynecological tumors.

Cancer 74: 2555-2561

Imai A, Ohno T, Iida K, Fuseya T, Furui T, Tamaya T (1994):

Presence of gonadotropin-releasing hormone receptor and its messenger ribonucleic acid in endometrial carcinoma and endometrium.

Gynecol Oncol 55: 114-118

Imai A, Takagi H, Furui T, Horibe S, Fuseya T, Tamaya (1996a):

Evidence for coupling of phosphotyrosine phosphatase to gonadotropin-releasing hormone receptors in ovarian carcinoma membrane.

Cancer 77: 132-137

Imai A, Takagi H, Horibe S, Fuseya T, Tamaya T (1996b):

Coupling of gonadotropin releasing hormone receptor to Gi protein in human reproductive tract tumors.

J Clin Endocrinol Metab 81: 3249-3253

Irmer G, Bürger C, Ortmann O, Schulz KD, Emons G (1994):

Expression of luteinizing hormone-releasing hormone and its mRNA in endometrial cancer cell lines.

J Clin Endocrinol Metab 79: 916-919

Irmer G (1995):

Zell- und molekularbiologische Untersuchungen zum Nachweis des Luteinisierenden Hormon-Releasing Hormons und seines Rezeptors in Ovarial- und Endometriumkarzinomen. Dissertationsschrift, Marburg 1995

Irmer G, Bürger C, Müller R, Ortmann O, Peter U, Kakar SS, Neill JD, Schulz KD, Emons G (1995):

Expression of the messenger RNAs for luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and its receptors in human ovarian epithelial carcinoma.

Cancer Res 55: 817-822

Jäger W, Wildt L, Lang N (1989):

Some observations on the effects of a GnRH analog in ovarian cancer.

Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 32: 137

Jelovsek FR, Hammond CB, Woodward BH, Draffin R, Lee KL, Creasman WT, Parker RT (1989):

Risk of exogenous therapy and endometrial cancer.

Am J Obstet Gynecol 137: 85-91

Kacinski BM, Carter D, Mittal K, Kohorn EI, Loodgood RS, Donahue J, Donofrio L, Edwards R, Schwartz PE, Chambers SK (1988):

High level expression of *fms* proto-oncogene mRNA is observed in clinically aggressive human endometrial adenocarcinoma.

Int J Radiat Oncol Biol Phys 15: 823-829

Kacinski BM, Chambers SK (1991):

Molecular biology of ovarian cancer.

Curr Opinion Oncol 3: 889-900

Kakar SS, Musgrove LC, Devor DC, Sellers JC, Neill JD (1992):

Cloning, sequencing, and expression of human gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor.

Biochem Biophys Res Commun 189: 289-295

Kakar SS, Grizzle WE, Neill JD (1994):

The nucleotide sequences of human GnRH receptors in breast and ovarian tumors are identical with that found in pituitary.

Mol Cell Endocrinol 106: 145-149

Kavanagh JJ, Wharton JT, Roberts WS (1987):

Androgen therapy in the treatment of refractory epithelial ovarian cancer.

Cancer Treat Rep 71: 537

Kavanagh JJ, Roberts W, Townsend P, Hewitt S (1989):

Leuprolide acetate in the treatment of refractory or persistent epithelial ovarian cancer.

J Clin Oncol 7: 115

Kleine W (1991):

Östrogen- und Progesteronrezeptoren beim Endometriumkarzinom.

In: Kleine W, Meerpohl HG, Pfeleiderer A, Profous CZ (eds.): Therapie des

Endometriumkarzinoms. Springer Verlag, pp 31-42

Kohler MF, Berchuck A, Davidoff AM, Humphrey PA, Dodge RK, Iglehart JD, Soper JT, Clarke-Pearson DL, Bast RC, Marks JR (1992):

Overexpression and mutation of p53 in endometrial carcinoma.

Cancer Res 52: 1622-1627

Kullander S (1992):

Treatment of endometrial cancer with GnRH analogs.

Recent Results Cancer Res 124: 69-73

Kuramoto H, Tamura S, Notake Y (1972a):

Establishment of a cell line of human endometrial adenocarcinoma in vitro.

Am J Obstet Gynecol 114: 1012-1019

Kuramoto H (1972b):

Studies of the growth and cytogenetic properties of human endometrial adenocarcinoma in culture and its development into an established line.

Acta Obstet Gynaecol Jpn 19(1): 47-58

Kutscher B, Bernd M, Beckers T, Polymeropoulos EE, Engel J (1997):

Chemie und Molekularbiologie bei der Suche nach neuen LHRH-Antagonisten.

Angew. Chemie 109: 2240-2254

Kvale G, Heuch J, Nilssen S, Beral V (1988):

Reproductive factors and risk of ovarian cancer: a prospective study.

Int J Cancer 42: 246-251

Lee NC, Wingo PA, Gwinn ML, Rubin GL, Kendrick JS, Webster LA, Ory HW (1987):

For the Cancer and Steroid Hormone Study of the Centers for Disease Control and the National Institute of Child Health and Human Development. The reduction in risk of ovarian cancer associates with oral contraceptive use.

New Engl J Med 316: 650-655

Lee MT, Liebow C, Kamer AR, Schally AV (1991):

Effects of epidermal growth factor and analogues of luteinizing hormone-releasing hormone and somatostatin on phosphorylation and dephosphorylation of tyrosine residues of specific protein substrates in various tumors.

Proc Natl Acad Sci USA 88: 1656-1660

Limonta P, Dondi D, Moretti R, Maggi R, Motta M (1992):

Antiproliferative effects of luteinizing hormone-releasing hormone agonists on the human prostatic cancer cell line LNCaP.

J Clin Endocrinol Metab 75: 207-212

Limonta P, Dondi D, Moretti RM, Fermo D, Garattini E, Motta M (1993):

Expression of luteinizing hormone-releasing hormone mRNA in the human prostatic cancer cell line LNCaP.

J Clin Endocrinol Metab 76: 797-800

Lindt MJ, Cantwell BMJ, Millward MJ, Robinson A, Proctor M, Simmons D, Carmichael J, Harris AL (1992):

A phase II trial of goserelin (Zoladex) in relapsed epithelial ovarian cancer.

Br J Cancer 65: 621-623

Liu TC, Wang PS, Jackson GL (1981):

Effects of GnRH and drugs that affect cAMP levels on LH synthesis and release.

Am J Physiol 241: E14-E21

Maier JAM, Voulalas P, Roeder D, Conway TA et al. (1990):

Extension of the lifespan of human endothelial cells by an interleukin-1 α antisense oligomer.
Science 249: 1570-1573

Marks JR, Davidoff AM, Kerns BJ, Humphrey PA, Pence JC, Dodge RK, Clarke-Pearson JD, Iglehart JD, Bast RC, Berchuck A (1991):

Overexpression and mutation of p53 in epithelial ovarian cancer.
Cancer Res 51: 2979-2984

Marshall CJ (1991):

Tumor suppressor genes.
Cell 64: 313-326

Marth C, Lang T, Cronauer MV, Doppler W, Zeimet AG, Bachmair F, Ullrich A, Daxenbichler G (1992):

Epidermal growth factor reduces HER-2 protein level in human ovarian carcinoma cells.
Int J Cancer 52(2): 311-316

Mason-Garcia M, Vigh S, Comaru-Shally AM, Redding TW, Somogyvari-Vigh A, Horvarth J, Schally AV (1985):

Radioimmunoassay for 6-D-tryptophane analog of luteinizing hormone-releasing hormone: Measurement of serum levels after administration of long-acting microcapsule formulations, Procl Natl Acad Sci 82: 1547-1551

Miller WR, Scott WN, Morris R, Fraser HM, Sharpe RM (1995):

Growth of human breast cancer cells inhibited by luteinizing hormone-releasing hormone agonist.
Nature 313: 231-233

Moretti MR, Montagnani Morelli M, Dondi D, Poletti A, Martini L, Motta M, Limonta P (1996):

Luteinizing hormone-releasing hormone agonist interfere with the stimulatory action of epidermal growth factor in human prostatic cancer cell lines, LNCaP and DU 145.
J Clin Endocrinol Metab 81: 3930-3937

Morishige KI, Kurachi H, Amamiya K, Adachi H, Inove M, Miyake A, Tanizawa O, Sakoyama Y (1991):

Involvement of transforming growth factor- α /epidermal growth factor receptor autocrine growth mechanism in an ovarian cancer cell line in vitro.

Cancer Res 51: 5951-5955

Müller V (1996):

Zellbiologische und biochemische Untersuchungen zu Signaltransduktionsmechanismen des Luteinisierenden Hormon-Releasing Hormons in Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien.

Dissertationsschrift, Marburg 1996

Müller V, Ortmann O, Schulz KD, Emons G (1996):

Inhibition of tyrosine kinase activity of human ovarian and endometrial cancer cells by LH-RH-agonist triptorelin.

Exp Clin Endocrinol Diabetes 104: 138 (Suppl. 1)

Mullis KB, Faloona FA (1987):

Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalyzed chain reaction.

Methods Enzymol 155: 335-350

Naor Z, Catt KJ (1981)

Mechanismm of action of gonadotropin-releasing hormone: involvement of phospholipid turnover in luteinizing hormone release.

J Biol Chem 256: 2226-2229

Naor Z (1990):

Signal transduction mechanisms of Ca^{2+} -mobilizing hormones. The case of gonadotropin-releasing hormone.

Endocrine Rev 11: 326-353

Naylor MS, Stamp GHW, Foulkes WD, Eccles D, Balkwill FR (1993):

Tumor necrosis factor and its receptors in human ovarian cancer: potential role in disease progression.

J Clin Invest 91: 2194-2206

Nett TM, Adams TE (1977):

Further studies on the radioimmunoassay of gonadotropin-releasing hormone: Effect of radioiodation, antiserum and unextracted serum on levels of immunoreactivity in serum.

Endocrinology 101: 1135-1144

Nishida M, Kasahara K, Kaneko M, Iwasaki H (1985):

Establishment of a new endometrial adenocarcinoma cell line, Ishikawa cells, containing estrogen and progesterone receptors.

Acta Obstet Gynaec Jpn 37: 1103-1111

Ohno T, Imai A, Furui T, Takahashi K, Tamaya T (1993):

Presence of gonadotropin-releasing hormone and its messenger ribonucleic acid in human ovarian epithelial carcinoma.

Am J Obstet Gynecol 169: 605-610

Onnis A, Marchetti M, Maggino T (1993):

Endometrial cancer treatment today.

Eur J Gynaec Oncol 2: 160-163

Oram DH, Jacobs JJ, Brady JL, Prys-Davis A (1990):

Early diagnosis of ovarian cancer.

Cancer Res 50: 103-107

Orlandi C, Marabini A, Mancini L, De Jaco PA, Costa A (1988):

Ovary cancer.

Adv Clin Oncol 3: 139-152

Ozols RF, Rubin SC, Dembo AJ, Robboy S (1992):

Epithelial ovarian cancer.

In: Hoskins WJ, Perez CA, Young RC (eds.). *Gynecologic Oncology*. Philadelphia, Lippincott, pp. 731-781

Pagesy P, Li JY, Berthet M, Peillon F (1992):

Evidence of gonadotropin-releasing hormone mRNA in the rat anterior pituitary.

Mol Endocrinol 6: 523-528

Pahwa GS, Vollmer G, Knuppen R, Emons G (1989):

Photoaffinity labelling of gonadotropin releasing hormone binding sites in human epithelial ovarian carcinomata.

Biochem Biophys Res Commun 161: 1086-1092

Pahwa GS, Kullander S, Vollmer G, Oberheuser F, Knuppen R, Emons G (1991):

Specific low affinity binding sites for gonadotropin-releasing hormone in human endometrial carcinomata.

Eur J Obstet Gynecol Rep Biol 41: 135-142

Parazzini F, Franceschi S, La Vecchia C, Fascioli M (1991a):

The epidemiology of ovarian cancer.

Gynecol Oncol 43: 9-23

Parazzini F, La Vecchia C, Bocciolone L, Franceschi S (1991b):

The epidemiology of endometrial cancer.

Gynecol Oncol 41: 1-16

Park RC, Grisby PW, Muss HB, Norris HJ (1992):

Corpus: Epithelial tumors.

In: Hoskins WJ, Perez CA, Young RC (eds.): *Gynecologic Oncology*. Philadelphia, Lippincott, pp. 663-693

Parkin DM, Laara E, Muir CS (1989):

Estimates of the world-wide frequency of sixteen major cancers in 1980.

Int J Cancer 41: 184-197

Parmar H, Rustin G, Lightman SL, Philipps RH, Hanham IW, Schally AV (1988):

Response to D-Trp-6-luteinizing hormone-releasing hormone (Decapeptyl) microcapsules in advanced ovarian cancer.

Br Med J 296: 1229

Petterson F (1988):

Annual report on the results of treatment in gynecological cancer.

Vol. 20, FIGO Stockholm

Pfleiderer A (1989):

Malignome des Ovars.

In: Wulf KH, Schmidt-Mathiesen H (eds.): Klinik der Frauenheilkunde und Geburtshilfe.

Spezielle gynäkologische Onkologie II. Urban & Schwarzenberg, pp. 37-129

Piver MS, Baker TR, Piedmonte M, Sandecki AM (1991):

Epidemiology and etiology of ovarian cancer.

Semin Oncol 18: 177-185

Quayum A, Gullick WJ, Mellon K, Krausz T, Neal D, Sikora K, Waxmann J (1991a):

The partial purification and characterization of GnRH-like activity from prostatic biopsy specimen and prostatic cancer cell lines.

J Steroid Biochem Molec Biol 37: 899-902

Rao BR, Slotman BJ (1991):

Endocrine factors in common epithelial ovarian cancer.

Endocrine Rev 12: 14-26

Renz M, Kurz C (1984):

A colorimetric method for DNA hybridization.

Nucl Acids Res 12: 3435-3444

Richardson GS, Dickersin GR, Atkins L, MacLaughlin DT, Raam S, Merk LP, Bradley FM (1984):

KLE: a cell line with defective estrogen receptor derived from undifferentiated endometrial cancer.

Gynecol Oncol 17: 213-230

Rodenburg CJ, Cornelisse CJ, Heintz PAM, Hermans J, Fleuren GJ (1987):

Tumor ploidy as a major factor in advanced ovarian cancer.

Cancer 59: 317-323

Rothschild N, Gray R, Smith L, Matelski H, Ahlgren J (1987):

Phase II study of aminoglutimide in advanced ovarian cancer.

Proc Am Soc Clin Oncol 6: 115

Rubin SC (1992):

Surgery for ovarian cancer.

Hematol/Oncol Clinics of North America 6: 851-865

Schally AV, Arimura A, Baba J, Nair RM, Matsuo H, Reeding TW, Debeljuk L (1971):

Isolation and properties of the FSH- and LH-releasing hormone.

Biochem Biophys Res Commun 43: 393-399

Schally AV, Bajusz S, Redding TW, Zalatnai A, Comura-Schally AM (1989):

Analogues of LHRH: The present and the future.

In: Vickery BH and Lunefeld B (eds.): GnRH analogues in cancer and human reproduction, Vol. 1. Basic aspects. Kluwer, Dordrecht, pp. 5-31

Schally AV, Comura-Schally AM, Hollander V (1993):

Hypothalamic and other peptide hormones.

In: Holland JF, Frei E, Bast RC, Kufe DW, Morton DL and Weichselbaum RR (eds.): Cancer Medicine, 3rd edition Lea & Febinger, Philadelphia PA, pp. 827-840

Schally AV (1994):

Hypothalamic hormones. From Neuroendocrinology to cancer therapy.

Anticancer Drugs 5: 115-130

Schmidt-Matthiesen H, Bastert G (1995):

Gynäkologische Onkologie.

Schattauer-Verlag, Stuttgart

Schmidt-Rhode P (1991):

Kontrolluntersuchungen während und nach einer medikamentösen Tumorthherapie -
Erkennung und Behandlung von Nebenwirkungen.

In: Kaiser R, Schulz KD, Maass H (eds.): hormonale Behandlung von Genital- und
Mammatumoren bei der Frau, Thieme, Stuttgart New York, pp 137

Schueler JA, Cornelisse CJ, Hermans J, Trimbo JB, von der Burg MEL, Fleuren GJ (1993):

Prognostic factors in well differentiated early stage epithelial ovarian cancer.

Cancer 71: 787-795

Schulz KD, Hofman J, Hackenberg R, Emons G, Schmidt-Rhode P, Sturm G (1991):

Palliative hormonal treatment in endometrial carcinoma.

In: Kleine W, Meerpohl HG, Pfeleiderer A, Profous CZ (eds.): Therapie des
Endometriumkarzinoms. Springer Verlag, pp. 119-129

Schulz KD, Emons G (1995):

Endometriumkarzinom.

In: Zeller WJ, zur Hausen H (eds.): Onkologie. Grundlagen, Diagnostik, Therapie,
Entwicklungen. Ecomed, Landsberg/Lech, V-2.9, 1-12.

Seeburg PH, Adelman JP (1984):

Characterization of cDNA for precursor of human luteinizing hormone-releasing hormone.

Nature 311: 666-668

Serov SF, Scully RE (1973):

Histological typing of ovarian tumors.

No. 9, Geneva: World Health Organization

Shirahige Y, Cook C, Pinski J, Halmos G, Nair R, Schally AV (1994):

Treatment with luteinizing hormone-releasing hormone antagonist SB-75 decreases levels of epidermal growth factor receptor and its mRNA in OV-1063 human epithelial ovarian cancer xenografts in nude mice.

Int J Oncol 5: 1031-1035

Silverberg SG (1984):

New aspects of endometrial carcinoma.

Clin Obstet Gynec 11: 189-208

Simon WE, Albrecht M, Hänsel M, Dietel M, Hölzel F (1983):

Cell lines derived from human ovarian carcinomas: growth stimulation by gonadotropic and steroid hormones.

J Natl Cancer Inst 70: 839-845

Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, Press MF (1989):

Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer

Science 244: 707-712

Soule HD, Vasquez J, Long A, Albert S, Brennan M (1973):

A human cell line from a pleural effusion derived from breast carcinoma.

J Natl Cancer Inst 51: 1409-1416

Sporn MB, Todaro GJ (1980):

Autocrine Secretion and malignant transformation of cells.

New Engl J Med 303: 878-880

Sporn MB, Roberts AB (1985):

Autocrine growth factors and cancer.

Nature 313: 745-747

Srkalovic G, Schally AV, Wittliff JL, Day TG Jr., Jenison EL (1998):

Presence and characteristics of receptors for [D-Trp6]luteinizing hormone releasing hormone and epidermal growth factor in human ovarian cancer.

Int J Oncol 12: 489-498

Stojilkovic SS, Reinhardt J, Catt KJ (1994)

Gonadotropin-releasing hormone receptors: Structure and signal transduction pathways.

Endocrine Rev 15: 462-499

Stojilkovic SS, Catt KJ (1995):

Expression and signal transduction pathways of gonadotropin releasing hormone receptors.

Rec Prog Horm Res 30: 161-205

Stromberg K, Collins TJ, Gordon AW, Jackson CL, Johnson GR (1992):

Transforming growth factor α acts as an autocrine growth factor in ovarian carcinoma cell lines.

Cancer Res 52: 341-347

Szende B, Srkalovic G, Schally AV, Lapis G, Groot K (1990):

Inhibitory effects of analogs of luteinizing hormone-releasing hormone and somatostatin on pancreatic cancers in hamsters. Events that accompany tumor regression.

Cancer 65: 2279-2290

Szende B, Srkalovic G, Timar J, Mulchahey JJ, Neill JD, Lapis K, Csikos A, Szepeshazi K, Schally (1991):

Localization of receptors for luteinizing hormone-releasing hormone in pancreatic and mammary cancer cells.

Proc Natl Acad Sci USA 88(10): 4153-4156

Szöke B, Horvarth J, Halmos G, Rekasi Z, Groot K, Nagy A, Schally AV (1994):
LH-RH analogue carrying a cytotoxic radical is internalized by rat pituitary cells in vitro.
Peptides 15: 359-366

Tan L, Rousseau P (1982):
The chemical identity of the immunoreactive LHRH-like peptide biosynthesized in the human placenta.
Biochem Biophys Res Commun 109: 1061-1071

Tashiro H, Miyazaki K, Okamura H, Iwai A, Fukumoto M (1992):
c-myc overexpression in human primary ovarian tumours: its relevance to tumour progression.
Int J Cancer 50: 828-833

Thompson MA, Adelson MD, Kaufman LM (1991):
Lupron retards proliferation of ovarian epithelial tumor cells cultured in serum free medium.
J Clin Endocrinol Metab 72: 1036-1041

Todaro GJ, DeLarco JE (1978):
Growth factor produced by sarcoma virus-transformed cells.
Cancer Res 38: 4147-4154

Tomas GM, Dembo AJ (1993):
Integrating radiation therapy into the management of ovarian cancer.
Cancer 71: 1710-1718

Vergote I, Kjorstad K, Abeler V, Vossli S (1991):
Postoperative vaginal irradiation by high-dose-rate cobalt afterloading in stage I endometrial cancer: Experience from the Norwegian Radium Hospital.
In: Kleine W, Meerpohl HG, Pfleiderer A, Profous CZ (eds.): Therapie des Endometriumkarzinoms. Springer Verlag, pp. 103-107

Völker P, Gründker C, Herrmann L, Schulz KD, Emons G (1998):
Expression of GnRH receptors in ovarian and endometrial cancer cell lines.
Archives of Gynecology and Obstetrics 261 Suppl. 1:158

Whitehead TP, Thorpe GHG, Carter TJN, Groucutt C, Kricka LJ (1983):

Enhanced luminescence procedure for sensitive determination of peroxidase labelled conjugates in immunoassay.

Natur 305: 158-159

Whittemore AS, Wu LM, Pfaffenbarger RS, Sarles DL, Kmpert JB, Grosser S, Jung DL, Ballon S, Hendrickson M, Mohle-Boetani J (1989):

Epithelial ovarian cancer and the ability to conceive.

Cancer Res 49: 4047-4052

Wu S, Rodbaugh K, Martinez-Maza O, Watson JM, Silberstein DS, Boyer CM, Peters WP, Weinberg JB, Berek JS, Bast RC Jr (1992):

Stimulation of ovarian tumor cell proliferation with monocyte products including interleukin-1-alpha, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha.

Am J Obstet Gynecol 166: 997-1007

Wu S, Boyer CM, Whitaker RS, Berchuk A, Wiener JR, Weinberg JB, Bast RC (1993):

Tumor necrosis factor- α as an autocrine and paracrine growth factor for ovarian cancer: monokine induction of tumor cell proliferation and tumor necrosis factor- α expression.

Cancer Res 41: 5107-5112

Yano T, Pinski J, Radulovic S, Schally AV (1994a):

Inhibition of human epithelial ovarian cancer cell growth in vitro by agonistic and antagonistic analogues of luteinizing hormone-releasing hormone.

Proc Natl Acad Sci 91: 1701-1705

Yano T, Pinski J, Halmos G, Szepeshazi K, Schally AV (1994b):

Inhibition of growth of OV-1063 human epithelial ovarian cancer xenografts in nude mice by treatment with luteinizing hormone-releasing hormone antagonist SB-75.

Proc Natl Acad Sci USA 91: 7090-7094

Yee D, Morales FR, Hamilton TC, von Hoff DD (1991):

Expression of insulin-like growth factor-1, its binding proteins and its receptor in ovarian cancer.

Cancer Res 41: 5107-5112

Zhou DJ, Gonzalez-Cadavid N, Ahuja H, Battifora H, Moore GE, Cline MJ (1988):

A unique pattern of proto-oncogene abnormalis in ovarian adenocarcinomas.

Cancer 62: 1573-1576

7. Danksagung

Ich bedanke mich bei

Herrn Prof. Dr. G. Emons für das äußerst interessante Thema, die sehr gute Zusammenarbeit, die vielen hilfreichen Diskussionen und Anregungen und für die gewissenhafte Durchsicht dieses Manuskripts,

bei Herrn Prof. Dr. B. Kadenbach, der sich als Erstgutachter dieser Arbeit zur Verfügung gestellt hat, vor allem für sein Interesse und die sehr nette und hilfreiche Unterstützung,

meinen ehemaligen Arbeitskollegen im Zellkultur- und Hormonlabor des Medizinischen Zentrums für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Philipps-Universität Marburg für die guten Hilfestellungen, den regen Informationsaustausch und das liebevolle Arbeitsklima,

und meinen derzeitigen Arbeitskollegen in der Abteilung Molekulare Gynäkologie der Georg-August-Universität Göttingen für ihre Unterstützung und ihr Verständnis, dabei vor allem Dr. rer. nat. Carsten Gründker für die hervorragende Kooperation als kritischer Ansprechpartner, die notwendigen Diskussionen und Hilfestellungen, die sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank geht auch an drei Kollegen im Marburger Zellkulturlabor, „Lille“ Schmidt, Martina Bauer und Peter Bloh, für die unverzichtbare Unterstützung in allen Labor- und auch Lebensfragen, geduldsamen Anleitungen sowie die vielen lustigen Stunden während der langen Arbeitstage, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Besondere Dankbarkeit schulde ich meiner Mutter, durch deren liebevolle Unterstützung und Hilfe mir es überhaupt erst möglich war die Chemie als Naturwissenschaft zu studieren und die mich auf meinem langen Weg bis heute begleitet und zu dem gemacht hat was ich bin. Ebenfalls dankbar bin ich meinen zukünftigen Schwiegereltern Doris und Hermann Trier, die mir im Alltag viele Dinge abgenommen und mich immer liebevoll betreut haben.

Des weiteren bedanke ich mich bei allen, die ich hier vergessen haben sollte, die diese Arbeit aber mit ermöglicht haben. Ohne Hilfe schafft man es nie!

Den größten Anteil an dieser Arbeit trägt meine zukünftige Frau Christiane, bei der ich mich auf diesem Wege für *ihr* unbeschreibliches Verständnis und vor allem für *ihren* Optimismus zur Fertigstellung der Arbeit bedanken möchte. *Sie* mußte meine Launen, meine Höhen und Tiefen, mein Chaos und den gesamten Streß ertragen. *Sie* tat und tut dies mit einer Herzlichkeit und Liebe, die ich bewundere und die mich sehr glücklich macht, demnächst mit *ihr* den Sprung ins Eheglück zu wagen. Ohne *Sie* wäre diese Arbeit nicht entstanden.

Danke Euch allen!

8. Publikationen

- (1) Völker P, Gründker C, Herrmann L, Schulz K-D, Emons G (1997):
Expression of GnRH and GnRH-receptors in endometrial and ovarian cancer cells.
Colloquium Endocrinologicum, Marburg

- (2) Gründker C, Völker P, Herrmann L, Schulz K-D, Emons G (1998):
GnRH inhibits the EGF-induced c-fos expression in endometrial and ovarian cancer.
Archives of Gynecology and Obstetrics 261 Suppl. 1:146

- (3) Völker P, Gründker C, Herrmann L, Schulz K-D, Emons G (1998):
Expression of GnRH receptors in ovarian and endometrial cancer cell lines.
Archives of Gynecology and Obstetrics 261 Suppl. 1:158

- (4) Gründker C, Völker P, Metz A, Schulz K-D, Emons G (1998):
GnRH inhibits proliferation of the breast cancer cell line MCF-7 via inhibition of the mitogenic signal transduction.
18. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Senologie, Düsseldorf

- (5) Emons G, Gründker C, Völker P (1999):
GnRH signal transduction in breast, ovarian and endometrial cancers.
Gynecological Endocrinology 13 Suppl. 1:12

- (6) Gründker C, Völker P, Schulz KD, Emons G (1999):
GnRH reduces endometrial, ovarian and breast cancer cell proliferation via inhibition of growth factor-induced mitogenic signal transduction.
Gynecological Endocrinology 13 Suppl. 1:12

- (7) Gründker C, Völker P, Schulz KD, Emons G (1999):
GnRH agonists and antagonists inhibit the EGF-induced c-fos expression in endometrial, ovarian and breast cancer cell lines.
Exp Clin Endocrinol Diab in press

- (8) Völker P, Gründker C, Schmidt O, Schmidt L, Schulz KD, Emons G (1999)

GnRH-analogue Triptorelin induces down regulation of GnRH receptors in human ovarian and endometrial cancer cell lines.

Exp Clin Endocrinol Diab in press

Nachtrag

zur

Dissertation

**„Signaltransduktion des Luteinisierenden Hormon-Releasing Hormons (LHRH)
in menschlichen Ovarial und Endometriumkarzinomen“**

dem

Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität
vorgelegt von

Peter Völker
aus Marburg

Marburg im Juni 1999

Korrigiert und genehmigt im Mai 2001
durch

Prof. Dr. Kadenbach

Prof. Dr. Emons

Aufgrund von nachträglichen Prüfungen durch einen Pathologen müssen folgende Daten, die die histologische Charakterisierung der untersuchten chirurgisch resezierten Primärtumoren des Ovars und Endometriums betreffen, in der Dissertation geändert werden. Die geänderten Daten verringern zwar die Anzahl der Primärtumoren von 40 auf 26 Stück, haben jedoch keine Auswirkungen auf die Kernaussagen der Dissertation.

Im Folgenden sind die geänderten Tabellen, Zahlen und Prozentwerte in Rot, in chronologischer Abfolge und unter Angabe der Seitenzahl und Zeilennummer aufgelistet.

Seite 58

Tab. II-4: Histologische Charakterisierung der chirurgisch resezierten Primärtumoren ~~und Tumormetastasen~~ des Ovars und Endometriums mit Bezifferung, klinischem Staging (I-IV nach FIGO) und histologischer Typisierung (Grade, G1-G3).

Nr.	Stage	Grade	Histologie
1	III C	G2	Seröses papilläres Adenokarzinom des Ovars
2	III A	G2	Teils endometrioses, teils serös papilläres Adenokarzinom des Ovars
3	III C	G3	Seröses papilläres Adenokarzinom des Ovars
4	IV A	G3	Seröses papilläres Adenokarzinom des Ovars
5	IV A	G3	Seröses papilläres Adenokarzinom des Ovars
6	III C	G3	Undifferenziertes Karzinom des Ovars
7	III C	G3	Seröses papilläres Adenokarzinom des Ovars
8	III A	G3	Seröses papilläres Adenokarzinom des Ovars
9	II A	G1	Seröses papilläres Adenokarzinom des Ovars
10	III C	G2	Seröses papilläres Adenokarzinom des Ovars
11	IV B	G3	Seröses papilläres Adenokarzinom des Ovars
12	III C	G3	undifferenziertes Adenokarzinom des Ovars
13	III C	G2	Seröses papilläres Adenokarzinom des Ovars
14	III C	G2	Seröses papilläres Adenokarzinom des Ovars
15	III C	G3	undifferenziertes Adenokarzinom des Ovars
16	III C	G3	Seröses papilläres Adenokarzinom des Ovars
17	IV A	G3	Seröses papilläres Adenokarzinom des Ovars
18	III C	G3	Seröses papilläres Adenokarzinom des Ovars
19	IV A	G3	Seröses papilläres Adenokarzinom des Ovars
20	III C	G3	endometrioses Adenokarzinom des Ovars
21	I B	G1	Endometrioses Adenokarzinom des Endometriums
22	III C	G2	Serös papilläres Adenokarzinom des Endometriums
23	III C	G3	Teils klarzelliges, teils serös papilläres Adenokarzinom des Endometriums
24	III A	G3	Serös papilläres Adenokarzinom des Endometriums
25	IV A	G3	Serös papilläres Adenokarzinom des Endometriums
26	II B	G2	Endometrioses Adenokarzinom des Endometriums

Tab. III-4: Nachweis von LHRH-Immunreaktivität in primärem Tumormaterial (zur Histologie: vgl. 2.5.).

Probe Nr.	LHRH-Immunreakt. [pg/mg Protein] \pm SD	Probe Nr.	LHRH-Immunreakt. [pg/mg Protein] \pm SD
1	18,8 \pm 7,2	15	38,8 \pm 16,9
2	11,8 \pm 1,9	16	24,3 \pm 5,1
3	5,1 \pm 0,4	17	2,7 \pm 0,2
4	4,0 \pm 0,7	18	17,2 \pm 4,9
5	5,7 \pm 3,2	19	4,5 \pm 6,3
6	12,9 \pm 4,1	20	29,8 \pm 17,2
7	5,3 \pm 1,1	21	3,5 \pm 0,1
8	23,6 \pm 8,4	22	21,4 \pm 19,1
9	11,6 \pm 3,4	23	16,4 \pm 5,7
10	9,3 \pm 11,1	24	25,8 \pm 25,8
11	30,4 \pm 17,2	25	9,0 \pm 1,6
12	1,9 \pm 0,9	26	16,0 \pm 1,2
13	29,6 \pm 14,8		
14	41,8 \pm 12,4	27	-

Insgesamt wurden 20 Proben von Ovarialkarzinomen (Nr. 1-20) und 6 Proben von Endometriumkarzinomen (Nr. 21-26) untersucht und bei allen eine LHRH-Immunreaktivität nachgewiesen (vgl. Tab. III-4).

Geht man davon aus, daß die Sensitivität des RIAs bei 2 pg LHRH/mg Protein liegt so lies sich bei insgesamt 100 % (20 von 20) der untersuchten Ovarialkarzinomgewebe die Synthese von LHRH oder eines ähnlichen Peptides nachweisen.

Als Negativkontrolle wurde ein Leiomyom (27) untersucht, bei dem keine LHRH-Immunreaktivität innerhalb der RIA-Nachweisgrenze demonstriert werden konnte. Die Meßwerte bezüglich der 6 Endometrium-karzinome (Nr. 21-26) bewegten sich in der gleichen Größenordnung wie die Daten der Ovarialkarzinome.

Tab. III-6: Ergebnisse der 2-Bindungsstellen-Scatchard-Analysen aus den Meßdaten des Radiorezeptorassays mit Plasmamembranpräparationen der verschiedenen Tumorgewebeproben (K_{d1} , Dissoziationskonstante; B_{max} , Maximale Bindungsstellenanzahl (Rezeptorkonzentration); -, keine Bindungsstelle vorhanden).

Probe Nr.	K_{d1} [*10 ⁻⁹ mol/L]	B_{max} [fmol/mg Protein]	<u>Probe</u> Nr.	K_{d1} [*10 ⁻⁹ mol/L]	B_{max} [fmol/mg Protein]
1	11	649	14	0,4	17
2	90	480	15	-	-
3	6,4	107	16	-	-
4	1,3	12	17	6,6	52
5	0,2	6	18	9,3	368
6	-	-	19	7	103
7	1,3	30	20	-	-
8	0,7	23	21	3,6	369
9	-	-	22	6,7	136
10	0,8	79	23	0,4	139
11	0,6	30	24	-	-
12	-	-	25	0,07	39
13	1,7	138	26	3,3	184

Die zusammenfassende Auswertung ergab, daß 70 % (14 von 20) der hier untersuchten resezierten Ovarialkarzinome (Proben-Nr. 1-20) hochaffine LHRH-Bindungsstellen exprimieren. Bei den Endometriumkarzinomen (Proben-Nr. 21-26) weisen 83 % (5 von 6) der untersuchten Tumorproben hochaffine Bindungsstellen auf.

Von den ebenfalls 20 untersuchten Gewebeproben aus Ovarialkarzinomen reagierten 18 in der RT-PCR mit den beiden Primerpaaren zum Nachweis der LHRH-mRNA positiv (90 %), während bei den untersuchten Endometriumkarzinomproben in 5 von 6 Fällen (83 %) die gesuchten mRNA-Sequenzen demonstriert werden konnte.

Bei den untersuchten Tumorproben von Ovarialkarzinomen konnte in 70 % (14 von 20) der Fälle DNA mit der Basenfolge des Gens für den humanen LHRH-Rezeptors amplifiziert werden. Von den 6 untersuchten Endometriumkarzinom-Proben reagierten 5 positiv (83 %).

Tab. III-7: Zusammenstellung der Ergebnisse der Amplifikation von cDNA-Proben aus Zelllinien und Tumorgewebe in der PCR mit den Oligonukleotidprimerpaaren Nr. 1 und Nr. 2 zum Nachweis von LHRH-Rezeptor-mRNA (+, positiv getestet; -, negativ getestet).

Material	cDNA-Probe	Primerpaar		Material	cDNA-Probe	Primerpaar	
		Nr. 1	Nr. 2			Nr. 1	Nr. 2
Ovarialkarzinom-zelllinien	EFO-21	+	+	Ovarialkarzinome	7	+	+
	EFO-27	+	+		8	+	+
	NIH: Ovarcar-3	+	+		9	-	-
	BG-1	+	+		10	+	+
	SK-OV-3	-	-		11	+	+
	SW 626	-	-		12	-	-
Endometriumkarzinomzelllinien	Ishikawa	-	+		13	+	+
	HEC-1A	-	+		14	+	+
	HEC-1B	+	+		15	-	-
	KLE	+	+		16	-	-
	AN-3-CA	+	+		17	+	+
	MFE 296	+	+		18	+	+
Kontrollen	MCF-7	+	+		19	+	+
	NRK	-	-		20	-	-
Ovarialkarzinome	1	+	+	Endometriumkarzinome	21	+	+
	2	+	+		22	+	+
	3	+	+		23	+	+
	4	+	+		24	-	-
	5	+	+		25	+	+
	6	-	-		26	+	+

Unter der Berücksichtigung der Tatsache, daß außerdem 20 der 20 Proben (100 %) von Ovarialkarzinomgeweben und 6 der 6 Endometriumkarzinomproben, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, LHRH-Aktivität produzierten, muß man annehmen, daß Karzinomzellen in vivo LHRH bilden und auch sezernieren.

Seite 96, Zeile 14-16

Die mRNA für LHRH konnte in 6/6 Ovarialkarzinomzelllinien, in 6/6 Endometriumkarzinomzelllinien, in 18/20 (90 %) Ovarialkarzinomen und in 5/6 (83 %) Endometriumkarzinomen nachgewiesen werden.

Seite 97, Zeile 12-15

Bei den untersuchten Tumorproben von Ovarialkarzinomen konnte in 70 % (14 von 20) der Fälle DNA mit der Basenfolge des Gens für den humanen LHRH-Rezeptors amplifiziert werden. Von den 6 untersuchten Endometriumkarzinom-Proben reagierten 5 positiv (83 %).

Seite 97, Zeile 32-34 fortlaufend Seite 98, Zeile 1-3

Die vorliegenden Resultate und die Ergebnisse früherer Untersuchungen (Emons et al. 1993b und 1993c) zeigen, daß in 4 von 6 Ovarialkarzinomzelllinien (EFO-21, EFO-27, NIH: Ovarcar-3, BG-1) und in 5 von 6 Endometriumkarzinomzelllinien (Ishikawa, HEC-1A, HEC-1B, AN-3-CA, KLE) sowie in 73 % (19 von 26) der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Ovarial- und Endometriumkarzinom sämtliche Komponenten für ein autokrines Regulationssystem exprimieren.

Seite 103, Zeile 29-30, fortlaufend Seite 104 Zeile 1-2

Ebenfalls untersucht wurden Proteinextrakte von 20 Ovarialkarzinomen und 6 Endometriumkarzinomen. Die gemessenen Werte im LHRH-RIA lagen dabei zwischen 2 und 42 pg/mg Protein. Dabei exprimierten 100 % (20 von 20) der Ovarialkarzinome und 100 % (6 von 6) der Endometriumkarzinome eine LHRH-Immunreaktivität.

Seite 104 Zeile 3-6

Sechs Ovarial-, sechs Endometrium- und eine Mammakarzinomzelllinie sowie 26 Ovarial- und Endometriumkarzinome wurden in einem spezifischen Radiorezeptorassay auf die Expression von LHRH-Bindungsstellen untersucht.

Bei der Untersuchung der Tumoren zeigten 70 % (14 von 20) der Ovarialkarzinome und 83 % (5 von 6) der Endometriumkarzinome hochaffine Bindungsstellen (K_d 0,1 – 90 nmol/L).

Die Expression der mRNA mit der gesuchten Basensequenz konnte in allen Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien sowie in 90 % (18 von 20) der malignen Tumoren des Ovars und in 83 % (5 von 6) Endometriumkarzinomproben nachgewiesen werden.

Bei den untersuchten Tumorproben von Ovarialkarzinomen reagierten 70 % (14 von 20) positiv. Von Endometriumkarzinomen konnten in 83 % (5 von 6) der Fälle DNA mit der Basenfolge des humanen hypophysären LHRH-Rezeptors amplifiziert werden.